Série A, N° 4 587
N° d'ordre : 5 434

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre PAULET

1re **THÈSE** — " ÉTUDE DE LA NÉOFORMATION *IN VITRO* DE BOURGEONS VÉGÉTATIFS ET FLORAUX. "

2e **THÈSE** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :
" LES PHÉNOL-OXYDASES DES VÉGÉTAUX. "

Soutenues le 14 octobre 1965, devant la Commission d'examen.

MM. GAUTHERET ..... *Président.*

LIORET .....
PREVOST..... *Examinateurs.*
NITSCH.....

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1965

Série A, N° 4 587
N° d'ordre : 5 434

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre PAULET

1re **THÈSE** — " ÉTUDE DE LA NÉOFORMATION *IN VITRO* DE BOURGEONS VÉGÉTATIFS ET FLORAUX. "

2e **THÈSE** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ : " LES PHÉNOL-OXYDASES DES VÉGÉTAUX. "

Soutenues le 14 octobre 1965, devant la Commission d'examen.

MM. GAUTHERET ..... *Président.*
LIORET .....
PREVOST..... *Examinateurs.*
NITSCH.....

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. ZAMANSKY

Professeurs :

BRELOT	T	Anal. sup.
PRENANT	T	Anat. et histol. comparées.
GRASSÉ.	T	Evol. des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et cristallogr.
TEISSIER.....	T	Zoologie.
MANGENOT ...	T	Biologie vég. (Orsay).
AUGER	T	Phys. quant. et relativité.
MONNIER	T	Physiol. générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale
N.....	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN..	T	Biolog. animale (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET.....	T	Zoologie.
KASTLER.....	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI ...	T	Génétique.
RIVIÈRE.....	T	Géologie SPCN et Sédim.
GAUTHERET...	T	Biologie végétale (P.C.B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET ...	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météorol. et dyn. atmosph.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN ...	T	Botanique.
DE CUGNAC ..	T	Biologie végét. (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER ...	T	Physique du globe.
L'HERITIER...	T	Biolog. gén. (Orsay.)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DU BREIL	T	Arith. et théor. des nombr.
QUELET.....	T	Chimie organique.
CAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER..	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ...	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscop. et diffr. électr.
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
JACQUINOT ..	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Phys. de l'atmosphère.
DESTOUCHES .	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (optique).
COUTEAUX ...	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théor. des fonct. et topol.
FELDMANN ..	T	Biologie végét. marine
GUINIER	T	Phys. des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathémat.
SCHWARTZ ...	T	Calcul. diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD ..	T	Aviation (Tech. aéronaut.).
NORMANT ...	T	Synthèse organique gén.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT.....	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ	T	Statist. mathématiques.
SOULAIRAC ..	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiol. végét. appl.
MARÉCHAL....	T	Optique théor. et appl.
KIRRMANN ..	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD ..	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la Nutrit.
LELONG.....	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS ..	T	Anatom. et Histol. Comp.
EHRESMANN ..	T	Topologie algébrique.
FRANÇON.....	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD .	T	Géogr. Phys. et Géol. dyn.
GODEMENT ..	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Tech. Mathém. de la Phys.
ROCH.....	T	Géologie.
SCHATZMAN...	T	Astrophysique.
TERMIER.....	T	Géologie générale.
ZAMANSKY....	T	Mathémat. générales.
LENNUIER ...	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER ...	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN.....	T	Electrotech. générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des Hautes Energies (Orsay).
Mme CHAIX...	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PANNETIER ..	T	Chimie gén.
BRUN.....	T	Mécan. théor. des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique. (Ors.).
Mme DUBREIL	T	Mathémat. (Agrég.).
Mme LELONG .	T	Mathémat. II (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J. E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
A. MICHEL....	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
GAUTHIER....	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ.	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS.....	T	Physiolog. végét. (Orsay).
CASTAING.....	T	Physique II Thermo (Ors.).
CURIEN	T	Minéral. et cristall.
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).

Mme Charniaux Cotton	T	Evol. des êtres organ.
Noirot	T	Evol. des êtres organisés.
Possompès	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Phys. nucl. et rad. activit.
Tonnelat	T	Biolog. physico chim. (Ors)
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dode	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biolog. vég. SPCN (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géom. alg. et théor. d. gr.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathémat. I (Orsay).
Deny	T	Mathémat. gén. (Orsay).
Germain	T	Mécan. théor. des fluides.
G. Lucas	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et phys. de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie.
Friedel	T	Phys. des solides (Orsay).
M. Julia	T	Etudes des molécules natur. complexes.
Lender	T	Biol. animale (SPCN) (Ors.)
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Ecologie vég. (Orsay.).
Guérin	T	Chimie M.P.C. (Orsay).
M. Chatelet	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique S.P.C.N.
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Therm. et mécan. phys.
Ellemberger	T	Géologie des gr. rég. du gl.
Franc	T	Biol. animale (P.C.B.).
Schnell		Botan. tropicale (Orsay.)
Stolkowski	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biol. (Orsay).
Baudoin	T	Biologie animale P.C.B.
Beaumont		Biologie animale S.P.C.N.
Blamont		Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
D. Curie		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organ. (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan		Physique, élect.
Daudel	T	Mécan. ondul. appliquée à la chim. théor. et à la phys. nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biol. végét. (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat		Mécan. anal. et mécan. cél.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécan. phys. et expérim.
Lacombe	T	Métall. des métaux nuclé.
Brochard	T	Physique P.C.B. (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathém. I. (Orsay).
Mazet	T	Mécaniq. générale (Orsay).
Caire		Géographie phys. et géol. dynamique.
Comolet	T	Mécanique des fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale. (Ors)
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale P.C.B.
J. Jullien		Chimie S.C.N.P. (Orsay).
Malgrange	T	Tech. math. de la physiq.
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique E.N.S. (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathémat. (E.N.S. fém.).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique SPCN.
Amat	T	Physique P.C.B.
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique Nucl. et radio-activité. (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.
Bruhat	T	Mathématiques M.P.C.
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal	T	Physique M.G.P. (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique Propé (Ors.).
D'Espagnat	T	Phys. théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie S.P.C.N.
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale P.C.B.
Guilbert		Physique (CUS Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie P.C.B.
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théor. des fluid.
Roubine		Electronique.
Silber	T	Chimie P.C.B.
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories physiques
Hervé	T	Mathématiques.
Néron	T	Mathém. M.P.C. (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique M.P.C.
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théor. (Orsay).
Gourdin		Phys. théor. des Hautes-Energies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale P.C.B.
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. Orsay.
Dars		Géologie struc. et géol. appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquière		Electronique (Orsay.).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U. Orléans).
Malliavin	T	Mathémat. propé Orsay
Gaudemar		Chimie Propéd.
Perez y Jorba		Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég. Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.

Lazard	Math M.P.C.
Morel Pierre	Physique M.P.C.
Arsac	Programmation.
Lefebvre	Chimie M.P.C.
Chapeville ..	Biochimie.
Benoit	Physique C.P.E.M.
Rio	Chimie C.P.E.M.
Jauzein	Géologie E.N.S.
Prévost G. ..	BV C.P.E.M.
Favard P. ..	BV C.P.E.M.
Vilkas	Chimie C.P.E.M.
Mlle Ficini ...	Chimie C.P E.M.
Lequeux	Astronomie.
Cohen Tannoudji	Physique M.P.C.
Tavernier ..	Physique C.P.E.M.
Mme Roizen...	Physique C.P.E.M.
Durand M. ..	BA S.P.C.N.
Pascaud	Physiologie.
Mme Petit ...	BA C.P.E.M.
Brousse.....	Géologie Orsay.
Cagniac	Physique agrégation Orsay.
Leberre	Zoologie (Orsay).
Scheffer.....	Microbiologie (Orsay).
De Gennes ..	Physique des solides (Orsay).
Riou	Physique nucl. exp. Ors.
Clauser.....	Chimie biolo. Orsay.
Chevalier....	Physio animale Orsay.
Jancovici	Physique atom. Orsay.
Falk-Vairant.	Physique nucléaire Orsay.
Fetizon	Chimie propé Orsay.
Cerf.....	Mathématiques Orsay.

Secrétaire général ..... R. Poullain

A mes parents et à ma femme.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0026

ÉTUDE DE LA NÉOFORMATION *IN VITRO* DE BOURGEONS VÉGÉTATIFS ET FLORAUX

par M. **Pierre PAULET**

AVANT-PROPOS

Ce travail sur les phénomènes de morphogénèse en culture de tissus a été accompli au laboratoire du Phytotron de Gif-sur-Yvette. Depuis 1958, M. J.-P. Nitsch, Ph. D., Directeur-adjoint du laboratoire, a dirigé mes recherches, m'a aidé et encouragé dans l'accomplissement de celles-ci. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement M. le Professeur R.J. Gautheret, membre de l'Institut, d'avoir bien voulu accepter de prendre cette thèse sous sa responsabilité et d'en présider le jury. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait l'honneur de s'être intéressé à mon travail.

A M. le Professeur C. Lioret, qui a eu la tâche ingrate de la critique, qui m'a aidé et permis de mener à bien la discussion de ce travail, j'adresse mes plus vifs remerciements.

Je tiens à faire part de toute ma gratitude à M. le Professeur G. Prévost. Il a été l'ami qui a aplani toutes les difficultés que j'ai pu rencontrer, qui m'a aidé, conseillé et réconforté dans les plus mauvaises périodes et je tiens à lui dire combien je lui suis reconnaissant de ce qu'il a fait pour moi.

Je remercie M. le Professeur P. Chouard, Directeur du Laboratoire du Phytotron qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Je remercie le Dr M. Zucker de New Haven (Connecticut) qui m'a mis sur la voie et m'a enseigné les méthodes d'étude des composés phénoliques.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Nitsch, M. Sandmeier et Mme Knight pour leur aide dans les tests biologiques, à Mme Masset qui m'a secondé efficacement, aux jardiniers du Phytotron, en particulier à l'équipe des Superserres, qui ont pris soin de mes plantes, aux Secrétaires, Mme Ivart et Mlle Hamon, enfin à tous mes camarades de laboratoire français ou étrangers.

Enfin, je remercie très vivement M. le Directeur de l'Institut des Tabacs de Bergerac et M. Izard qui me sont maintes fois venus en aide avec beaucoup de gentillesse et de célérité.

INTRODUCTION

Lorsque nous avons commencé ce travail notre but était d'étudier la régulation chimique du phénomène de néoformation des bourgeons en nous inspirant des travaux antérieurs, en particulier de ceux de Prévot sur *Begonia rex* et de Skoog et ses collaborateurs sur *Nicotiana tabacum*.

Après un premier travail sur des disques de feuilles de *Cardamine pratensis*, nous nous sommes orientés vers la culture de tissus qui offre l'avantage d'un contrôle plus rigoureux des conditions expérimentales, et nous avons abandonné *Cardamine pratensis* au profit d'autres espèces génétiquement mieux définies.

A la suite d'essais préliminaires sur différentes espèces nous avons choisi trois *Nicotiana* (*Nicotiana suaveolens*, *N. glauca* et leur hybride amphidiploïde) qui semblaient mieux convenir aux expériences projetées. C'est sur la culture *in vitro* des tronçons de tige de ces espèces qu'a porté l'essentiel de notre étude.

L'application des résultats obtenus avec les *Nicotiana* au bourgeonnement d'explantats de racines d'endive nous fit découvrir que, dans certaines conditions, ces tissus produisaient des boutons floraux capables d'évoluer en fleurs épanouies. Nous avons alors cherché à définir les conditions dans lesquelles se formaient les boutons floraux et nous nous sommes efforcés de préciser quels étaient les facteurs qui conduisaient à l'induction florale.

La comparaison des facteurs présidant à la formation des bourgeons, plus accessoirement des racines, et de ceux qui conduisent à l'obtention de fleurs nous a fait émettre une hypothèse (voir tableau XXXV) sur le contrôle physiologique de ces phénomènes de morphogénèse. L'expression nette d'une idée peut, en effet, être utile à l'avancement de la connaissance de ce problème, même si elle n'est encore qu'une grossière approximation de la réalité.

On peut distinguer deux étapes dans les phénomènes de néoformation d'organes :

1) une phase allant du déclenchement des mitoses à la formation d'un cal, c'est-à-dire une phase comportant une prolifération anarchique des cellules,

2) une phase d'orientation de cette prolifération cellulaire vers la formation d'organes différenciés.

Nous avons voulu étudier quelques-uns des facteurs qui participent à la régulation de cette deuxième phase, c'est-à-dire ceux qui orientent le développement vers la formation soit des bourgeons végétatifs, soit des boutons floraux, soit des racines. L'étiologie de la néoformation des racines étant relativement bien connue, nous n'avons abordé son étude qu'accessoirement.

Les résultats qui ont été obtenus sont principalement d'ordre qualitatif et nous n'avons pas encore la possibilité de faire de nos matériels des « tests biologiques ». L'étude statistique que nous avons ébauchée permet de penser néanmoins qu'un jour il sera possible de reprendre cette étude sur un plan quantitatif et de l'appliquer ainsi à d'autres problèmes.

I. — HISTORIQUE

I. — PREMIÈRES ÉTUDES CONCERNANT LA RÉGULATION CHIMIQUE DE LA NÉOFORMATION DES BOURGEONS

Les horticulteurs multiplient couramment le *Begonia rex* Putz. au moyen de boutures de feuilles qui régénèrent des bourgeons et des racines.

Les premières études approfondies sur la régulation de ces néoformations sont dûes à Bouillenne et surtout à son élève Prévot. Le résumé des observations antérieures faites sur ce sujet se trouve présenté dans les mises au point de Hartsema datant de 1924 et de 1926.

Dès 1932, Bouillenne et Prévot font paraître une note préliminaire sur les phénomènes de néoformation chez *Begonia rex* dans laquelle ils déterminent la polarité des formations de bourgeons et de racines. Après une série de notes présentées avec Bouillenne (1933, 1934) où sont étudiées les différences anatomiques et physiologiques existant entre les parties proximales et distales des morceaux de feuilles mises en expérience, Prévot reprendra seul le travail en 1935, mettant en évidence une inhibition du bourgeonnement des feuilles en relation avec la tige, puis découvrant un phénomène que nous n'avons pu reprendre, faute de temps, sur notre matériel, l'influence favorable de l'anaérobiose dans la néoformation des bourgeons (1936).

En 1937, il montre le rôle stimulateur d'un engrais à base d'excréments de pigeons. Sans le savoir, il réalise ainsi la première expérience sur l'action des purines dans la néoformation des bourgeons. On sait, en effet, que les excréments d'oiseaux sont très riches en acide urique.

En 1938, Prévot étudie le rôle de l'acide indolyl-3-acétique sur les néoformations de *Begonia rex* et trouve que ce dernier n'inhibe pas la formation des bourgeons, ceci en accord avec les travaux de Chouard sur *Alloplectus lynchei* (1938), mais en opposition avec ceux de Gautheret sur l'endive (1941 *a*), La contradiction apparente est levée par les travaux de Stoughton et Plant en 1938 sur le transport de l'auxine.

Enfin, après avoir publié le mémoire résumant ses travaux (1939 *a*), Prévot montre le caractère génétique de la propension

à former des bourgeons et sa transmissibilité comme caractère dominant (1939 b).

Bien que n'ayant pas été faits dans des conditions rigoureusement contrôlées, les travaux de Prévot constituent une source d'idées precieuses sur la diversité des facteurs qui peuvent intervenir dans les phénomènes de néoformation de bourgeons et de racines.

Cherchant un système mieux défini permettant une expérimentation à la fois plus pratique et plus rigoureuse, Paulet et Nitsch (1959) et Paulet (1960) se sont adressés à un clône de *Cardamine* (*Cardamine pratensis*). L'application de nombreux composés chimiques à des disques découpés dans le foliole terminal de cette plante a montré l'effet stimulateur de certains corps sur la formation des bourgeons. Les produits qui stimulent le bourgeonnement le plus vigoureusement sont les bases puriques et pyrimidiques, leurs précurseurs (sels d'ammonium, glycocolle, acide orotique, etc.) et des substances, comme l'acide folique, qui jouent un rôle dans la synthèse des acides nucléiques. Ce travail a permis de mettre en évidence 3 étapes dans la néoformation des bourgeons, à savoir :

a) une levée d'inhibition permettant le déclenchement des mitoses,

b) une orientation des mitoses vers la formation des bourgeons, liée au métabolisme des acides nucléiques,

c) une croissance des bourgeons, liée à la présence de facteurs trophiques (nitrates, asparagine, glucides).

Ces résultats avaient été obtenus en traitant des disques de feuilles pendant 24 heures avec les substances à essayer. Les disques étaient ensuite lavés à l'eau distillée et maintenus 15 à 17 jours en atmosphère humide dans des boîtes de Petri. Une telle technique réduisait au minimum le développement de microorganismes, mais ne l'éliminait pas de façon absolue. C'est pourquoi nous avons cherché à améliorer encore nos méthodes en travaillant en conditions totalement aseptiques par le moyen des cultures de tissus.

II. — CONTRIBUTION DE LA MÉTHODE DE CULTURE *IN VITRO* AUX RECHERCHES SUR LA NÉOFORMATION DES BOURGEONS

Avec les travaux de White et de Gautheret, la culture des tissus a, en effet, ouvert une voie nouvelle à l'étude de la physiologie de la morphogénèse.

En 1939, White montre que le fait de cultiver des tissus tumoraux de l'hybride *N. glauca* × *N. langsdorffii* en milieu liquide provoque la néoformation de bourgeons. De 1940 à 1942, Gau-

THERET montre que des fragments de tissus d'orme, de peuplier, de sureau donnent des bourgeons qui apparaissent après une période d'une quinzaine de jours. SEGRÉTAIN (1941) observe le développement spontané d'organes sur des fragments de tige de tabac cultivés *in vitro*. GAUTHERET (1942) montre que la formation de bourgeons a lieu pour de faibles concentrations d'auxine et est inhibée pour de fortes concentrations.

A partir de ces travaux, SKOOG et ses collaborateurs vont s'attacher au problème de la régulation chimique des phénomènes de morphogénèse.

SKOOG en 1944 publie sa première étude sur l'organogénèse du tabac, montrant essentiellement le rôle de l'auxine sur la croissance et celui du gradient d'oxygène sur la formation d'organes. En 1948, avec TSUI, il met en évidence l'effet stimulateur de l'adénine sur la formation des bourgeons. Cependant cette propriété de l'adénine n'est pas générale puisque cette substance est incapable de provoquer le bourgeonnement de cultures de tiges d'autres espèces, par exemple celles de *Pelargonium zonale* (MAYER, 1956). En 1950, SKOOG montre le rôle des différentes bases puriques et pyrimidiques sur le bourgeonnement et pense que seule est active l'adénine. En 1953, MILLER et SKOOG démontrent l'existence d'une interaction entre l'auxine et l'adénine et trouvent que seule la guanine peut remplacer l'adénine. En 1955 et 1956, MILLER, SKOOG, OKUMURA, VON SALTZA et STRONG isolent et synthétisent un cofacteur de division cellulaire, la 6-furfurylaminopurine, à laquelle ils donnent le nom de « kinétine ». DAS, PATAU et SKOOG, en 1956, étudient l'action de la kinétine sur la multiplication des cellules de moëlle de tabac, puis SKOOG et MILLER (1957) sur l'organogénèse de fragments de tige de cette même espèce. Ils aboutissent à la théorie que les phénomènes de morphogénèse sont régis par un équilibre auxine-kinétine, l'auxine inhibant le bourgeonnement et favorisant la rhizogénèse, la kinétine ayant un effet inverse.

De nombreux autres auteurs ont contribué à étoffer nos connaissances dans ce domaine. Ainsi LEVINE (1950) a montré que, si les tissus de *Nicotiania langsdorffii* et *Nicotiana affinis* donnent aisément des bourgeons en cultures *in vitro*, ceux de *N. glauca* et *N. glutinosa* sont incapables d'en produire. JACQUIOT (1951) a mis en évidence l'action stimulante du méso-inositol sur la formation des bourgeons chez *Ulmus campestris*. DANCKWARDT-LILLIESTRÖM (1957), sur des racines d'*Isatis tinctoria*, et TORREY (1958) sur des racines de *Convolvulus*, confirment les résultats de SKOOG et MILLER, concernant la stimulation du bourgeonnement par la kinétine. STICHEL (1958), sur *Cyclamen persicum*, obtient des résultats assez comparables à ceux de SKOOG par l'action

conjuguée de l'acide naphtalène-acétique, l'adénine et l'acide nicotinique, travaux complétés par ceux de Wurm (1960). En 1961, Eliason montre l'influence inhibitrice des auxines synthétiques du groupe phénoxyacétique sur la formation des bourgeons par des racines de tremble.

Enfin signalons les thèses de La Motte (1960) et de Lee (1962) citées par Murashige (1964), sur le bourgeonnement des cals de tabac qui n'ont pas été publiées à ce jour (1) et dont nous n'avons pu prendre connaissance.

Une vue d'ensemble des travaux accomplis dans ce domaine est clairement donnée dans le livre de Gautheret (1959). Aussi, plutôt que de nous étendre longuement sur cet historique, nous préférons renvoyer le lecteur à cet excellent traité, complété par la mise au point faite par le même auteur en 1964, et par les récents chapitres de l'Encyclopedia of Plant Physiology (Wardlaw, 1965 ; Dore, 1965).

En conclusion nous pouvons dire que la plupart des travaux accomplis dans ce domaine confirment l'hypothèse de Skoog et Miller sur la régulation de la morphogénèse par un équilibre auxine-kinétine bien que celle-ci, comme, nous le montrerons sur *Nicotiana glauca*, souffre des exceptions. Jusqu'ici cependant, peu d'auteurs ont étudié la composition chimique des tissus mis en expérience. Des substances diverses étaient incorporées aux milieux de culture sans que l'on tînt compte de ce qui existait à l'intérieur des tissus.

Or il semble bien, comme vont le montrer les résultats que nous avons obtenus, que l'effet de la composition du milieu soit intimement lié à la composition du tissu ou de l'organe mis en culture.

III. — LA NÉOFORMATION DE FLEURS EN CULTURE DE TISSUS

De nombreux auteurs ont obtenu la formation de fleurs à partir d'apex d'espèces, photopériodiques ou non, cultivés *in vitro*. Parmi les travaux antérieurs à 1962 on peut citer ceux sur la cuscute (Loo, 1946 ; Baldev, 1959), le soleil (Henrickson, 1954), le *Perilla* (Chailakhian, 1961 ; Raghavan et Jacobs, 1961), le pois (Nitsch, 1961), le *Chenopodium album* (Wetmore, 1959, non publié), etc. Le travail de Henrickson (1954) est particulièrement révélateur. Cet auteur a employé des points végétatifs

(1) Une partie du travail de Lee a été publié depuis le dépôt de ce mémoire sous le titre : Lee, T.T., et F. Skoog, Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 18 : 386-402, 1965.

de plantules d'*Helianthus annuus*. Il a remarqué que ces points végétatifs produisaient des fleurs à condition que :

a) les racines se forment tard,

b) un fragment (1/8 à 1/2) de cotylédon reste attaché au point végétatif (la floraison ne se produisait pas si on supprimait complètement les cotylédons ; elle ne se produisait pas non plus si on laissait trop de tissus cotylédonnaires, par exemple un cotylédon entier),

c) le milieu contienne du sucre (2% de saccharose),

d) les cultures reçoivent une intensité lumineuse suffisante (jours longs de 16 h ; pas de floraison avec 100 lux, meilleure floraison avec 8000 lux qu'avec 4000).

La néoformation de bourgeons floraux a été obtenue pour la première fois par Mme Aghion (Chouard et Aghion, 1961 ; Aghion, 1962). Ces boutons, dont certains se sont développés en fleurs normales qui ont pu être pollinisées et ont donné des graines viables, sont apparus sur les tissus déjà « floraux », les hampes florales de *Nicotiana tabacum*, variété « Wisconsin 38 ».

Parmi les nombreux auteurs tels que Gautheret (1941,1942, 1944), Buvat, (1944,1945) et Camus (1949) qui ont pratiqué la culture des tissus d'endive et étudié sur ce matériel la formation de bourgeons, aucun n'a jamais obtenu de fleurs, probablement parce que les racines employées n'avaient pas subi l'action vernalisante du froid. Les résultats que nous allons exposer plus loin montrent qu'il est possible d'obtenir la néoformation de fleurs normales sur des fragments de racines d'endive.

II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1) MATÉRIELS VÉGÉTAUX

Nos expériences ont tout d'abord porté sur deux espèces de tabac et leur hybride : *Nicotiana glauca* Grah., *Nicotiana suaveolens* Lehm. et l'hybride amphidiploïde stable.

Les graines de ces trois types de *Nicotiana* nous ont été fournies par l'Institut des Tabacs de Bergerac. Les plantes ont été cultivées sur bourre de verre « verrane » et « vermiculite » (mica expansé) arrosées automatiquement par la solution nutritive standard employée aux " Superserres " du Phytotron de Gif-sur-Yvette (voir Waterkeyn et coll. 1965). Les plantes ont été élevées à la lumière naturelle, la température des serres étant de 25-28°C durant le jour et de 18-22°C la nuit.

Nous avons aussi utilisé l'endive, *Cichorium intybus* L. cultivar « Witloof ». Les plantes étaient issues de graines Vilmorin. Les plantes non vernalisées ont été cultivées dans les superserres de la même façon que les *Nicotiana*. Les plantes vernalisées ont été semées en plein champ ; leurs racines, récoltées à l'automne, ont été stockées à 1°C, dans du sable, pendant quatre mois environ.

2) CULTURE DES TISSUS VÉGÉTAUX

A - Préparation des fragments de tiges des trois types de *Nicotiana*.

Les tiges jeunes, c'est-à-dire non encore fortement lignifiées (et nous pensons que c'est en fait ce caractère qui importe) ont été prélevées sur des plantes de 0,7 à 1 mètre de haut. Une fois débarrassées de leurs feuilles, les tiges ont été lavées et brossées à l'eau additionnée de détergent (« Teepol »), rincées à l'eau, puis rapidement passées à l'éthanol à 95 % et enfin plongées pendant 7 minutes environ dans une solution d'hypochlorite de calcium (90 g/l).

Après un rinçage à l'eau stérile ces tiges ont été débitées en tronçons de 8 mm environ de long et plantées horizontalement sur divers milieux.

B - Préparation des explantats de racine d'endive.

Au moment de l'utilisation, les racines ont été lavées, pelées et stérilisées pendant une demi-heure par immersion dans de l'hypochlorite de calcium à 9 %. Les racines ont été coupées en tranches de trois cm d'épaisseur environ dans lesquelles des cylindres de tissus ont été prélevés au moyen d'un trocart de 4 mm de diamètre. Ces cylindres ont été débités en tronçons de 5 mm de longueur au moyen de deux lames de rasoir parallèles. Toutes ces opérations ont été faites aseptiquement.

C - Milieux de culture

Nous avons employé principalement deux types de milieux de base :

1) *Milieu K.* — Lors de nos premières expériences, aussi bien sur les trois types de *Nicotiana* que sur l'endive, nous avons employé un milieu contenant la solution minérale de Knop diluée de moitié préconisée par Gautheret (1959), c'est-à-dire par litre de milieu final :

$Ca(NO_3)_2, 4\,H_2O$	500 mg
KNO_3	125 mg
$MgSO_4, 7H_2O$	125 mg
KH_2PO_4	125 mg

additionné de la solution d'oligo-éléments de Heller (1953), de chlorhydrate

de thiamine (10 mg), de gélose (« Bacto Agar Difco » 8 g) et d'une quantité variable de saccharose et d'acide indolyl-3-acétique, le pH étant ajusté à 5,5 avant l'autoclavage.

2) *Milieu S.* — Par la suite nous avons préféré le milieu préconisé par Murashige et Skoog (1962), avec remplacement de l'hydrolysat de caséine par 200 mg/l de *l*-glutamine préconisé par Nitsch (non publié). Ce milieu contient par litre de solution finale :

a) *Macro-éléments* :	en g	
KNC_3	1,900	dans H_2O q.s.p. 1000 ml de milieu
NH_4NO_3	1,650	
$CaCl_2$, 2 H_2O	0,400	
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,370	
KH_2PO_4	0,170	

b) *Oligo-éléments* :	en mg
$MnSO_4$, 4 H_2O	22,3
$ZnSO_4$, 7 H_2O	8,6
H_3BO_3	6,26
KI	0,83
Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,35
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,025
$CoCl_2$, 6 H_2O	0,025

c) 5 *ml de la solution suivante de* Na_2Fe EDTA :

$FeSO_4$, 7 H_2O	5,57 g
Na_2 EDTA	7,45 g
H_2O	1 litre

d) *Constituants organiques* :	
Glutamine	200 mg
Myo-inositol	100 mg
Glycine	2 mg
Acide nicotinique	0,5 mg
Pyridoxine-HCl	0,5 mg
Thiamine-HCl	0,1 mg

e) *Agar :* 8 g

f) Des quantités variables de saccharose et d'acide indolyl-3-acétique qui seront précisées par la suite.

Le pH était ajusté à 5,5 avec NaOH ou HCl avant l'autoclavage.

Ce milieu différencie mieux les effets des substances de multiplication cellulaire telle que la 6-furfurylaminopurine (kinétine) et a toujours donné une croissance nettement plus vigoureuse des explantats.

Tous les milieux ont été autoclavés 20 minutes à 110 °C, sauf dans certains cas où les solutions ont été stérilisées selon la technique de J.P. Nitsch et C. Nitsch (1957) par filtration sur membrane d'ester de cellulose de 47 mm de diamètre et de 150 μ d'épaisseur retenant des particules supérieures à 0,5μ[2] (Millipore Filter Corporation).

D - Conditions de culture

Les cultures ont ensuite été placées dans une enceinte dont la température moyenne était d'environ 28 °C pendant le jour et de 22 °C la nuit. Elles étaient éclairées, selon le cas, 18 heures ou 10 heures par jour par un plafond lumineux composé de tubes fluorescents et d'ampoules incandescentes produisant une intensité lumineuse de 7000 lux environ à l'extérieur des tubes de culture.

3) TECHNIQUES D'EXTRACTION

Toutes les extractions ont été faites à partir de tiges jeunes, non encore fortement lignifiées, prélevées à 11 heures et demi du matin. Les tiges coupées ont été immédiatement plongées dans l'azote liquide.

A - Extraction des composés phénoliques des *Nicotiana.*

Les tiges jeunes des *Nicotiana* ont été lyophilisées et réduites en poudre.

Dans chaque cas, 15 g de matériel sec ont été extraits (en chambre froide à 1 °C) par trois fois au méthanol à 80 %. Une fois filtrées, les trois fractions méthanoliques ont été réunies et évaporées à sec dans un évaporateur rotatif, sous vide partiel.

Le résidu a été repris par une petite quantité (5 ml) de méthanol à 80 % et chromatographié sur du papier Whatman 3 MM.

B - Extraction des auxines des tiges de *Nicotiana*.

Des tiges jeunes, aussi comparables que possible, ont été lyophilisées, puis réduites en poudre.

Pour chacun des trois types de *Nicotiana*, 200 mg de matériel sec ont été extraits par trois fois au méthanol absolu (1) dans un bain de glace. Les extraits réunis ont été évaporés à sec dans un évaporateur rotatif et repris par 0,8 ml de méthanol, dont 0,1 ml (équivalant à 25 mg) a été chromatographié sur une bande de papier Whatman 3 MM de 2 cm de large.

C - Extraction des cytokinines de *Cichorium* et de *Taraxacum*.

100 g de racines fraîches, préalablement lavées et pelées sont broyées à trois reprises avec du méthanol (1), cette opération se faisant dans une chambre froide. L'extrait est filtré puis évaporé a sec dans un évaporateur rotatif et repris anfin par 100 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5,5.

Cet extrait est additionné de 500 mg de charbon actif qui adsorbe les cytokinines, et agité durant 1 heure. Le charbon est ensuite filtré sur terre d'infusoires, puis élué trois fois avec du méthanol distillé bouillant. Cet éluat est évaporé à sec et repris par 5 ml de méthanol avant d'être chromatographié.

4) MÉTHODE DE CHROMATOGRAPHIE

Dans toutes nos expériences nous avons utilisé la chromatographie ascendante à une dimension, la température étant maintenue constante à 15 °C.

A - Chromatographie des composés phénoliques

Nous avons utilisé de grandes feuilles de papier Whatman 3 MM. Le solvant était composé d'acide formique à 2 %. Six heures d'équilibration préalable du chromatogramme dans la cuve sont nécessaires à l'obtention de bons résultats à la température à laquelle nous avons opéré (15°).

La position de l'acide chlorogénique et celle d'autres composés a été repérée par la fluorescence qu'ils produisaient dans l'ultra-violet long (longueur d'onde 350 mμ environ).

B - Chromatographie des substances auxiniques

La méthode utilisée est celle de Nitsch et Nitsch (1955) qui fait usage de bandes de papier Whatman 3 MM de 2 cm de large. Le solvant a pour composition (en volume) :

isopropanol (80) + NH_4OH à 28 % (0,05) + H_2O (20).

Après équilibration des chromatogrammes une nuit au-dessus des vapeurs du solvant, on enfonce l'extrémité inférieure des papiers dans le solvant et on laisse monter le solvant 20 cm au-dessus de la ligne de départ. Après séchage à la température du laboratoire, le chromatogramme est découpé transversalement en bandes de 1 cm de large dont l'activité biologique est déterminée au moyen du test mésocotyle de Nitsch et Nitsch que nous décrirons plus loin.

C - Chromatographie des cytokinines

Le papier utilisé est le papier Whatman n° 1 qui permet de localiser les purines par leur absorption dans l'U.V. court, absorption que l'on observe par transparence. Le solvant est le suivant :

n-butanol (86) + H_2O (14).

Les composés absorbant dans l'UV court sont localisés à l'aide d'une lampe Rotax du type UV/FL (longueur d'onde : 250 mμ environ).

(1) Le méthanol employé a toujours été préalablement redistillé sur Zn et KOH.

5) TESTS BIOLOGIQUES

Pour déceler et doser les substances de croissance du type auxine, gibbérelline et cytokinine, nous avons fait appel à trois tests : le test « mésocotyle » qui réagit aux auxines et aux gibbérellines, le test maïs nain qui est spécifique des gibbérellines et le test moëlle de tabac qui est spécifique des cytokinines.

a) *Test « mésocotyle »*. — Le test « mésocotyle » fait usage de la propriété qu'ont certaines régions du premier entrenœud d'avoine de réagir à une application d'auxine ou de gibbérelline par un allongement qui est proportionnel au logarithme de la concentration. Ce test est particulièrement adapté à la recherche des auxines et des gibbérellines sur les chromatogrammes. Nous ne le décrirons pas, mais renvoyons le lecteur aux publications originales (Nitsch et Nitsch, 1956, 1962).

b) Test maïs nain. — Les substances actives sur le test mésocotyle pouvant appartenir au groupe des gibbérellines aussi bien qu'à celui des auxines, nous avons eu recours au test maïs nain de Phinney (1956) pour départager ces deux groupes. On sait, en effet, que certains mutants de maïs, le « dwarf 3 » en particulier, sont spécifiques des gibbérellines. La technique que nous avons employée est celle décrite dans l'article de Nitsch et Nitsch (1962) auquel nous renvoyons le lecteur.

c) *Test moëlle de tabac.* — Pour déceler la présence de cytokinines dans nos extraits, nous avons employé un test moëlle de tabac dérivé de celui de Jablonski et Skoog (1954). De petits cylindres de 4 mm de diamètre et de 5 mm de long sont prélevés aseptiquement dans la moëlle de tiges de tabac « Wisconsin 38 » et plantés horizontalement sur le milieu S contenant 3 % de saccharose et 1 mg/l d'AIA mais dépourvu de kinétine. Aucune prolifération ne se produit quand le milieu ne renferme pas de cytokinine. Par contre, si l'extrait renferme une substance de ce type, les cultures prolifèrent. On pèse les cultures après 3 semaines de croissance. Nous nous sommes servi de ce test pour déceler la présence de cytokinine dans nos extraits.

6) DOSAGE DES SUCRES DANS LES DEUX ESPÈCES DE *NICOTIANA* ET LEUR HYBRIDE

Dans tous les cas nous avons opéré sur du matériel lyophilisé et broyé finement (tiges non lignifiées).

L'extraction des sucres a été faite par l'eau bouillante. Par cette méthode on extrait principalement les oses, les polyholosides de faible poids moléculaire et les glucofructosanes, mais ces derniers n'interviennent pratiquement pas dans le cas des *Nicotiana*.

Quatre grammes de matériel sec de chacun des trois *Nicotiana* sont prélevés. L'extraction est réalisée avec environ 75 ml d'eau bouillante et l'ébullition est maintenue pendant 10 minutes. Ce processus est répété trois fois de suite. La solution ainsi obtenue est alors débarrassée des protéines, tanins et pigments qu'elle pourrait contenir par le procédé classique de défécation par l'acétate neutre de plomb en quantité juste suffisante pour éviter un excès. Le précipité est éliminé par centrifugation et lavé à l'eau distillée afin de récupérer les sucres qui pourraient être adsorbés. On obtient ainsi la solution sur laquelle sont faits les dosages.

Ces dosages ont été effectués par la méthode classique de Bertrand basée sur des propriétés réductrices des sucres mis en présence d'une solution basique d'oxyde cuivrique. Nous avons effectué deux types de dosages :

— dosage des réducteurs libres,

— dosage des réducteurs obtenus après hydrolyse acide douce. Pour cela on amène le pH à 2 avec de l'acide chlorhydrique et l'on maintient la solution dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

Ce dernier type de dosage permet de connaître la quantité de saccharose dans les échantillons ; il représente les 90 à 95 % des sucres libérés par cette hydrolyse.

7) DOSAGE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE

L'acide chlorogénique des trois *Nicotiana* a été dosé par la méthode de Zucker et Ahrens (1958) qui utilise la réaction de Hoepfner (1932).

La réaction de Hoepfner est basée sur le fait que l'acide chlorogénique réagit avec le nitrite et l'acide acétique pour produire une coloration jaune. L'addition de soude change la teinte jaune du complexe en une coloration rouge vif.

Selon Zucker et Ahrens, nous avons utilisé 10 ml d'un extrait méthanolique correspondant à 50 mg de poids sec, de façon à travailler avec des quantités de l'ordre de 0,1 à 1 micromole d'acide chlorogénique. Cet extrait est versé sur une petite colonne d'alumine préalablement lavée à l'eau. L'acide chlorogénique, adsorbé par la partie supérieure de la colonne (bande jaune), est lavé avec 5 ml d'eau. Puis on ajoute une solution (fraîchement préparée) contenant 2 ml de nitrite de sodium à 0,5 % et 2 ml d'acide acétique à 5 %. La bande jaune devient orange ou marron quand la solution la traverse. Après avoir rincé de nouveau avec de l'eau, on ajoute 5 ml de soude 5*N*. La pigmentation orangée devient alors rouge vif et descend le long de la colonne. L'éluat alcalin est recueilli au bas de la colonne et l'on ajoute assez d'eau sur celle-ci pour obtenir un volume d'éluat égal à 10 ml. Après agitation, on mesure au spectrophotomètre (Beckman DK-2) l'absorption de la solution aqueuse rouge à 520 mμ. On peut ainsi doser colorimétriquement l'acide chlorogénique par comparaison avec les absorptions à 520 mμ de solutions de titres connus.

D'autres produits, tels que l'acide caféique, réagissent aussi avec le réactif de Hoepfner et peuvent fausser le dosage. Aussi avons-nous fait les dosages au spectrophotomètre après séparation de l'acide chlorogénique des autres composés phénoliques sur colonne de gel de silice, selon la méthode de Hanson et Zucker (1963).

8) MODE DE PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Dans les tableaux de résultats qui vont être présentés dans ce mémoire on touve deux colonnes distinctes :

— l'une donnant le nombre des cultures présentant des bourgeons,

— l'autre donnant le nombre de bourgeons formés.

Pour permettre une comparaison numérique plus aisée des résultats, nous avons donné, d'une part, le pourcentage de cultures ayant produit des bourgeons, d'autre part le nombre de bourgeons produits pour 10 cultures. Ce nombre a été calculé d'après le nombre total de bourgeons comptés.

Il est évident que l'intensité du bourgeonnement est exprimée à la fois par le pourcentage des *cultures* produisant un ou plusieurs bourgeons et par le nombre de *bourgeons* produits. C'est pourquoi nous avons employé simultanément ces deux critères.

9) ANALYSE STATISTIQUE DE LA RÉPARTITION DES CULTURES EN CLASSES D'APRÈS LE NOMBRE DE BOURGEONS FORMÉS

Dans certains cas, en particulier dans les séries-témoins contenant de l'AIA, un nombre relativement élevé de cultures ne produit aucun bourgeon. Nous nous sommes demandé si les échantillons comportant « zéro bourgeon » trouvaient place dans une distribution de Poisson. Le cas contraire indiquerait l'existence d'un autre type de distribution.

Nous avons donc mis en expérience des séries de soixante cultures sur le milieu S, additionné des produits suivants :

1) aucun (série témoin),
2) + AIA (1 mg/l),
3) + AIA (1 mg/l) + adénine (10^{-5} *M*),
4) + AIA (1 mg/l) + kinétine (1 mg/l).

Un mois après, nous avons compté les bourgeons visibles macroscopiquement sur chacune des cultures. Nous avons réparti les résultats observés en classes et déterminé le pourcentage des cultures ayant produit 1 bourgeon, 2 bourgeons... *n* bourgeons. Dans les cas où le bourgeonnement était très intense (milieu témoin et milieu avec auxine plus kinétine) nous avons échelonné les classes de 2 en 2, ou même de 10 en 10 bourgeons.

Nous avons ensuite calculé le pourcentage de cultures qui devraient s'inscrire dans chacune des classes, si la distribution des résultats suivait une courbe de Poisson. On trouvera le détail des résultats dans les tableaux I à IV.

TABLEAU I

Etude statistique de la répartition des bourgeons sur 60 fragments de tige de Nicotiana suaveolens *cultivés sur milieu S sans auxine.*

Résultats obtenus après 1 mois de culture

Classes (nombre de bourgeons par culture)	Répartion observée des cultures par classe : nombre	Répartion observée des cultures par classe : pourcentage (« O »)	Répartition calculée pour M = 4,5 pourcentage (« C »)	$\frac{(O-C)^2}{C}$
1 à 2	1	1,6	1,1	0,22
3 à 4	4	6,6	5	0,51
5 à 6	7	11,6	11,2	0,01
7 à 8	15	25	16,9	3,8
9 à 10	13	21,6	18,9	0,38
11 à 12	10	16,6	17,1	0,01
13 à 14	6	10	12,8	0,62
15 à 16	4	6,6	(6,8)	(0,01)

O = Pourcentage observé. — C = Pourcentage calculé. — M = moyenne.
Nombre total de bourgeons : 550.

Moyenne par culture : $\frac{550}{60} = 9 = 4,5 \times 2$ bourgeons.

$\chi^2 = 5,56$.

χ^2 correspondant à 7 degrés de liberté est significatif pour des valeurs comprises entre 0,50 et 0,90 ; mais, si l'on ne tient pas compte de la 4e classe, $\chi^2 = 1,76$ pour 6 degrés de liberté, ce qui n'est pas significatif et indique que la répartition se fait selon une courbe de Poisson.

TABLEAU II

Etude statistique de la répartition des bourgeons sur 57 fragments de tiges de Nicotiana suaveolens *cultivés sur milieu S en présence d'*AIA (1 mg/l).

Résultats obtenus après 1 mois de culture

Classes (nombre de bourgeons par culture)	Répartition des cultures par classe : nombre	Répartition des cultures par classe : pourcentage (« O »)	Répartition théorique pour M = 3 (« C »)	$\frac{(C-O)^2}{C}$
0	13	23	4	90
1	8	14	14	0
2	7	12	22	4
3	6	10	22	6
4	3	5	16	7
5	7	12	10	1
6	3	5	5	0
7	5	8	2	18
8	2	3	1	4
9	1	2	0	4
10	2	3	0	9

O = Pourcentage observé — C = Pourcentage calculé. — M = Moyenne.
Total des bourgeons : 185.

Moyenne par culture : $\frac{185}{57} = 3,2$

$\chi^2 = 143$ pour 9 degrés de liberté : hautement significatif ($P < 0,0001$).

TABLEAU III

Etude statistique de la répartition des bourgeons sur 60 fragments de tiges de Nicotiana suaveolens *cultivés sur milieu S en présence d'AIA (1 mg/l) et d'adénine (10^{-5} M)*
Résultats obtenus après 1 mois de culture

Classes (nombre de bourgeons par culture)	Répartition observée des cultures par classe : nombre	Répartition observée des cultures par classe : pourcentage (« O »)	Répartition calculée pour M = 3 (« C »)	$\frac{(C-O)^2}{C}$
0	1	2	(1)	1
1	2	3	(1)	4
2	6	10	1	(81)
3	3	5	5	0
4	5	8	9	1
5	6	10	12	0,3
6	10	17	15	0,3
7	9	15	15	0
8	3	5	13	5
9	3	5	10	2,5
10	7	11	7	2
11	1	2	4	2
12	2	3	2	1
13	1	2	1	0
14	0	0	(1)	1
15	1	2	(1)	1

O = Pourcentage observé. — C = Pourcentage calculé. — M = Moyenne.
Total des bourgeons : 380.

Moyenne par culture : $\frac{380}{60} = 6{,}3$.

$\chi^2 = 21$ avec 11 degrés de liberté (en éliminant la classe 2) : tout juste significatif ($P = 0{,}1$).

TABLEAU IV

Etude statistique de la répartition des bourgeons sur 57 fragments de tige de Nicotiana suaveolens *cultivés sur milieu S additionné de kinétine (1 mg/l) et d'AIA (1 mg/l)*
Résultats obtenus après 1 mois de culture

Classes (nombre de bourgeons par culture)	Répartition observée des cultures par classe : nombre	Répartition observée des cultures par classe : pourcentage (« O »)	Répartition calculée pour M = 3,5 pourcentage (« C »)	$\frac{(C-O)^2}{C}$
0 à 10	0	0	0,5	0,5
10 à 19	10	17,5	14,9	0,4
20 à 29	14	24,5	22,4	0,2
30 à 39	15	26,3	22,4	0,3
40 à 49	12	21	16,8	0,8
50 à 59	6	10,5	10,1	0,0
plus de 59	0	0	0,5	0,5

O = Pourcentage observé. — C = Pourcentage calculé. — M = Moyenne.
Nombre total de bourgeons : 1821.

Moyenne : $\frac{1821}{57} = 32$ bourgeons par culture, soit $3{,}2 \times 10$.

$\chi^2 = 2{,}7$
χ^2 tout juste significatif pour $\alpha = 0{,}90$ et 6 degrés de liberté. On a donc 90 chances sur 100 d'avoir une répartition de Poisson.

La comparaison des résultats calculés et observés est plus immédiatement visible sur les courbes de la fig. 1. Les cercles blancs reliés par une courbe donnent les pourcentages théoriques correspondant à une distribution de Poisson. Les cercles noirs donnent les pourcentages expérimentaux.

On voit immédiatement que :

a) lorsque le milieu S ne renferme pas d'AIA, la distribution des cultures par classes de bourgeonnement correspond à une distribution de Poisson ;

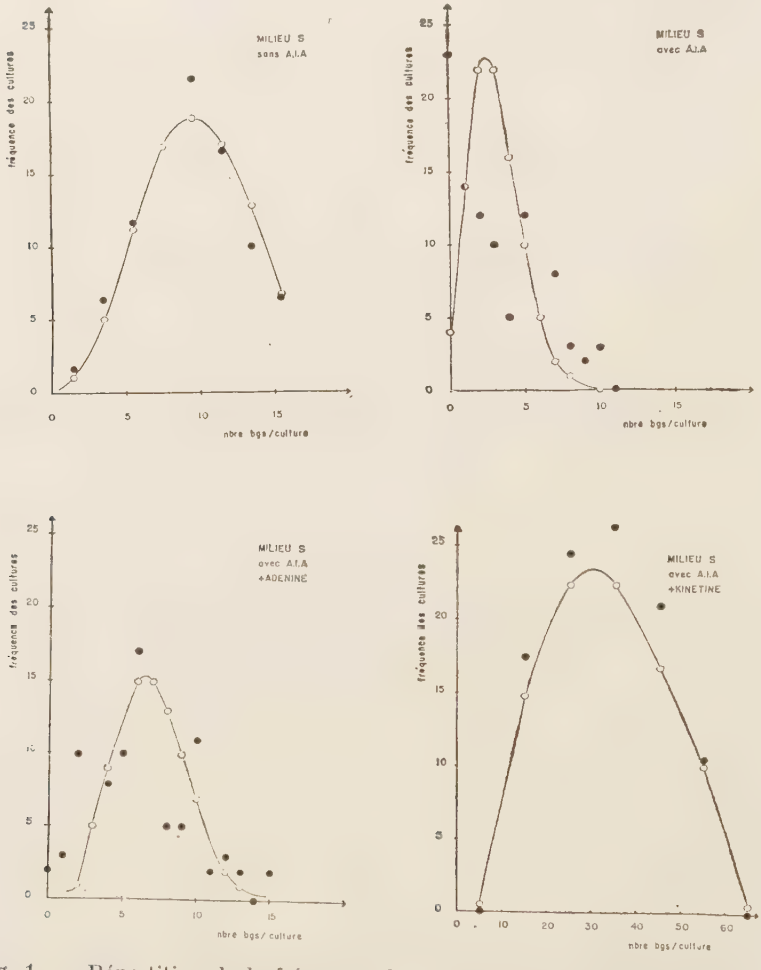


Fig. 1. — Répartition de la fréquence des cultures de tige de *N. suaveolens* produisant un nombre donné de bourgeons sur milieu S sans auxine (*en haut, à gauche*), avec 1 mg/l d'AIA (*en haut, à droite*), avec AIA $+10^{-5}$ *M* d'adénine (*en bas, à gauche*), avec AIA + 1 mg/l de kinétine (*en bas, à droite*). Cercles blancs reliés par une courbe : pourcentages calculés correspondant à une distribution de Poisson. Cercles noirs : pourcentages observés expérimentalement.

b) lorsque le milieu S renferme 1 mg/l d'AIA, la distribution des cultures ne suit plus du tout une courbe de Poisson ;

c) lorsque, en présence de 1 mg/l d'AIA, on ajoute soit de l'adénine, soit surtout de la kinétine, la distribution des cultures par classes de bourgeonnement se rapproche à nouveau d'une répartition de Poisson ; tout se passe donc comme si ces purines rendaient à nouveau « normal » le métabolisme perturbé par l'auxine, un peu comme la kinétine maintient dans un équilibre « normal » le métabolisme des cultures de tissus qui, sans elle, auraient tendance à devenir anormales sous l'action de l'auxine seule. Gautheret (1955) a montré en effet que, sous l'action répétée de l'auxine seule, les cultures de certains tissus deviennent « anergiées » alors que cette transformation vers un métabolisme aberrant ne se fait pas si on ajoute de la kinétine en plus de l'auxine (Duarte, Spangersberg et Gautheret, 1963).

10) ÉTUDE STATISTIQUE DU ROLE DE LA « VIGUEUR » DES CULTURES DANS L'INTENSITÉ DU BOURGEONNEMENT.

On peut penser que les facteurs qui favorisent une abondante prolifération des tissus favorisent, *ipso facto*, un bourgeonnement plus abondant. L'ensemble de nos expériences nous a convaincu cependant qu'il n'en n'est pas ainsi. D'une part, il existe des facteurs qui augmentent beaucoup la croissance des explantats sans accroître pour autant le bourgeonnement. D'autres

TABLEAU V

Comparaison des poids de bourgeons et de cals formés par des fragments égaux de tige de Nicotiana suaveolens *cultivés sur milieu S sans auxine.*

Résultats après 1 mois de culture

Numéro du tube	Nombre de bourgeons par culture	Poids (mg) des bourgeons (par culture) :		Poids (mg) des cultures sans les bourgeons	
		matériel frais	matériel sec	matériel frais	matériel sec
		mg	mg	mg	mg
1	8	100,2	7,45	220,4	23,5
2	7	187,5	12,95	241,3	22,3
3	8	13,9	1,5	167,4	24,25
4	5	70,1	5	190,2	20,8
5	15	116,4	7,7	189	20,4
6	4	119,4	8	117,2	27,8
7	5	49,2	3,9	165,4	14,5
8	6	11,2	1,1	251,6	25,45
9	13	221,2	3,9	187	22,8
10	8	236,2	7	178	17,8
11	12	81,4	13,9	152,1	17,65
12	6	58,5	5	248	16
13	17	107,9	7,4	169	23,6
14	12	53,5	4,9	192,1	23,4
15	7	173	8,45	205,7	19,15
16	9	53,5	10,65	175,6	26,5
17	11	104,9	11,05	183,8	25,4
18	9	201,8	7,2	214,4	20,3
19	10	69,1	8,55	214,6	19,25
20	16	104,8	8,9	206,8	21,9
21	12	50,6	4,1	192,0	29,9
22	15	82	7,75	254,1	20,4
23	14	40,1	5,15	162	20,6
Somme	229	2145,0	161,3	4508,8	503,7
Moyenne	10	102,3	7,01	196	21,9

facteurs, au contraire, augmentent le bourgeonnement sans accroître outre mesure le poids total de matière vivante.

L'expérience suivante va permettre de fixer les idées. Nous avons ensemencé, sur le milieu S, des fragments égaux de tiges de *Nicotiana suaveolens* répartis en deux séries : l'une contenant 1 mg/l d'AIA, l'autre n'en contenant pas. Au bout d'un mois, nous avons déterminé séparément les poids de matière fraîche et de matière sèche des cals et des bourgeons. Les résultats de ces pesées sont consignés dans les tableaux V et VI. On voit immédiatement que les cultures faites en présence d'auxine ont formé des cals nettement plus gros que celles sans auxine (moyenne des poids frais de cals : 369,7 mg au lieu de 196 mg).

TABLEAU VI

Comparaison des poids de bourgeons et de cals formés par des fragments égaux de tige de Nicotiana suaveolens *cultivés sur milieu S contenant 1 mg/l d'AIA.*

Résultats après 1 mois de culture

Numéro du tube	Nombre de bourgeons par culture	Poids (mg) des bourgeons (par culture)		Poids (mg) des cultures sans les bourgeons	
		matériel frais	matériel sec	matériel frais	matériel sec
		mg	mg	mg	mg
1	5	42,4	4,7	307,8	34,85
2	12	12,2	2,1	329,8	37,8
3	6	108,2	8,3	375,8	32,9
4	1	87,6	7,8	347	34
5	6	107,0	8	290,6	27,25
6	8	78,6	7,3	289,5	27,95
7	9	69,8	5,6	333,2	30,55
8	3	131	9,1	425,6	36
9	2	12,7	2,9	459,1	42,05
10	3	73,7	5,5	310	28,6
11	1	4,5	1,3	277	29,45
12	8	190,8	12,8	527,1	42,5
13	2	140,5	9,55	439,7	38,9
14	4	108,4	8,05	422,1	39
15	4	106,1	8,45	356,2	31,2
16	1	88,3	6,2	342,6	33,7
17	3	22,2	3,25	346	39
18	7	228	2,9	348	30,8
19	6	13,85	12,25	301,5	32,45
20	7	142,6	10,6	377,5	34
21	5	182,2	11,7	313,5	30,7
22	9	145,8	11	254,5	25
Somme :	112	1891,2	159,3	7764,1	735,6
Moyenne :	5,35	90	7,24	369,7	33,4

Cependant les premières ont formé en moyenne moitié moins de bourgeons que les secondes (5,35 bourgeons contre 10). Les résultats numériques montrent enfin que le *poids* des bourgeons développés après un mois est sensiblement le même dans les deux cas (90 mg de poids frais contre 102,3 mg). L'effet de l'auxine est donc d'accroître la « vigueur » des bourgeons (qui sont plus gros) aussi bien que celle des cals, mais de diminuer le *nombre* de bourgeons néoformés). Un examen statistique confirme le résultat des observations visuelles. Comparons à l'aide du test *t*, les moyennes obtenues pour les poids de matériel frais et sec des cals et des bourgeons ainsi que pour les nombres de bourgeons. Les résultats sont les suivants :

a) *Poids de matière fraîche des cals* :

Moyenne série « T » : 196 mg
Moyenne série « A » : 369,7 mg dm 173,7 mg
t calculé : 10,2
t table (pour $\alpha = 0{,}001$) : 3,291
donc dm humainement certain.

b) *Poids de matière sèche des cals* :

Moyenne série « T » : 21,9 mg
Moyenne série « A » : 33,4 mg dm 11,5 mg
t calculé : 8
t table (pour $\alpha = 0{,}01$) : 3,291
donc dm hautement significatif.

c) *Poids de matière fraîche des bourgeons* :

Moyenne série « T » : 102,3 mg
Moyenne série « A » : 90,0 mg dm = 12,3 mg
t calculé : 0,64
t table (pour $\alpha = 0{,}05$) : 1,96
donc dm non significatif.

d) *Poids de matière sèche des bourgeons* :

Moyenne série « T » : 7,01 mg
Moyenne série « A » : 7, 24 mg dm 0,23 mg
t calculé : 0,69
t table (pour $\alpha = 0{,}05$) : 1,96
donc dm non significatif.

e) *Nombre de bourgeons* :

témoins sans AIA : 10 bg par culture
témoins AIA (1 mg/l) : 5 bg par culture dm 5 bg
t calculé : 5
t table (pour α : 0,001) : 3,291.
donc dm humainement certain.

Cette étude prouve que l'AIA, quoique donnant une plus grande vigueur, inhibe la formation des bourgeons. Le nombre de bourgeons formés est un meilleur critère que leur poids dans notre genre d'expérience. C'est donc ce critère que nous allons employer dans la suite de notre travail.

Afin de montrer qu'il n'y a pas de corrélation entre le poids des cals et le nombre des bourgeons formés, on peut diviser un même lot de cultures en deux classes, les cultures produisant peu de bourgeons (par exemple moins de 10 dans la série sans AIA), et les cultures en fournissant plus (plus de 10 bourgeons dans la même série). On obtient pour moyennes en poids frais des cals :

pour la première classe : $m_1 = 193{,}4 \pm 25{,}8$ mg,
pour la deuxième classe : $m_2 = 191{,}1 \pm 18{,}7$ mg.

Les poids moyens des cals sont donc sensiblement les mêmes, alors que la production de bourgeons est très différente. Ici encore, il n'y a pas de corrélation entre l'ampleur du développement du cal et la production des bourgeons.

III. — RÉSULTATS

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES SUR LA NÉOFORMATION DES BOURGEONS VÉGÉTATIFS

A. — POSITION DU PROBLÈME

Au cours d'un travail précédent (Paulet et Nitsch, 1959 ; Paulet, 1960), nous avons analysé les facteurs chimiques qui modifient le bourgeonnement de disques de limbes de feuilles de *Cardamine pratensis* L. L'action stimulatrice des sels d'ammonium, des bases puriques et pyrimidiques et de certains de leurs précurseurs, celle de l'acide gibbérellique, ainsi que l'effet des sucres, nous ont conduit à distinguer, dans la néoformation des bourgeons, les trois étapes suivantes :

1) une levée d'inhibition permettant le déclenchement des mitoses,

2) une orientation des mitoses vers la formation des bourgeons fiée plus directement à la capacité de synthèse des acides nucléiques,

3) une croissance des bourgeons, liée à la présence de facteurs trophiques.

Nous avons abandonné momentanément ce matériel pour plusieurs raisons. D'une part, les feuilles de *Cardamine pratensis* possèdent, à la jointure des nervures, des méristèmes préformés qui se développent en bourgeons au bout de quatre jours ; bien que les disques de limbes que nous avons employés n'en forment qu'au bout de dix-sept jours, on peut penser qu'il existe des cellules spéciales capables de reformer rapidement ces méristèmes ; il faut noter cependant que nous n'en avons pas trouvées dans les coupes histologiques. D'autre part, il semble que le nombre de bourgeons formés, ainsi que nous l'avait fait remarqur M. le Professeur Gautheret, atteigne un maximum d'une vingtaine de bourgeons pour vingt disques et que, de ce fait, on puisse mal comparer l'action stimulante d'une substance à celle d'une autre substance. Il n'en reste pas moins que ce matériel constitue un moyen rapide pour déterminer si une substance est favorable ou non au bourgeonnement. Enfin la Cardamine a une tendance naturelle au bourgeonnement. Or, ainsi que l'ont remarqué certains

auteurs dont Gautheret (dans Skoog, 1950, discussion), s'il est relativement facile de modifier expérimentalement le degré de bourgeonnement de tissus qui ont naturellement cette propension, il a été jusqu'ici impossible de provoquer le bourgeonnement de tissus qui n'ont pas spontanément cette faculté. En d'autres termes, la constitution génétique d'une plante joue un rôle important dans ce phénomène, ainsi que l'a montré Prévot (1939) dans le cas de *Begonia rex*.

Pour faire progresser les recherches dans ce domaine nous avons attaqué le problème sous deux angles différents :

A) en partant d'un tissu qui possède génétiquement la capacité de bourgeonner, nous avons essayé d'analyser, en employant les cultures aseptiques, l'importance relative des différents facteurs connus pour augmenter ou diminuer l'intensité du bourgeonnement (auxines, cytokinines, etc.) ; ce tissu, nous l'avons trouvé dans la tige de *Nicotiana suaveolens* ;

B) une fois étudiés les principaux facteurs modifiant le bourgeonnement, nous avons recherché s'ils faisaient défaut à des tissus d'une espèce apparemment incapale de bourgeonner : *Nicotiana glauca*.

B. — LA NÉOFORMATION DE BOURGEONS CHEZ *NICOTIANA GLAUCA*, *NICOTIANA SUAVEOLENS* ET LEUR HYBRIDE

Au cours d'une étude préliminaire (Paulet et Nitsch, 1963) nous avons pu constater que, lorsqu'on plante des tronçons de tige de *N. glauca*, de *N. suaveolens* et de leur hybride sur le milieu K ou le milieu S contenant de l'AIA (1 mg/l), du saccharose (3%) et additionnés ou non de 1 mg/l de kinétine on obtient, après trois semaines environ de culture, les résultats suivants :

— *N. glauca* (Pl. I, fig. 1) : aucun bourgeon ne se forme, ni sur le milieu témoin renfermant seulement de l'AIA comme l'avait déjà montré Levine (1950), ni sur le milieu contenant à la fois AIA et kinétine (série « Kin. 1 »). Nous avons essayé plusieurs concentrations de kinétine (0,1, 1 et 10 mg/l) et aussi d'adénine (10^{-5} *M*, 10^{-4} *M*), ainsi que le mélange des deux substances (10^{-5} *M*), toujours en présence d'AIA, sans jamais obtenir de bourgeon.

— *N. suaveolens* (Pl. I, fig. 2) : tous les fragments plantés produisent des bourgeons, y compris ceux cultivés sur milieu témoin « T » contenant 1 mg/l d'AIA. La kinétine augmente considérablement le nombre de bourgeons formés et accélère leur développement. La concentration optimale de kinétine (en présence de 1 mg/l d'AIA) se situe aux alentours de 1 mg/l.

— Hybride *N. glauca* × *N. suaveolens* (Pl. II) : au bout de

trois semaines, on n'observe pas de bourgeons sur le milieu K additionné d'AIA. Dans le cas du milieu de base S, on obtient parfois quelques bourgeons. L'addition de kinétine aux milieux fait apparaître des bourgeons sur toutes les cultures.

Les différences observées dans le bourgeonnement des trois types étudiés pourraient s'expliquer de plusieurs manières :

1) ou bien *N. suaveolens* produit une plus grande quantité d'un facteur de bourgeonnement qui n'existerait pas chez *Nicotiana glauca*,

2) ou bien *N. glauca* produit un principe inhibiteur du bourgeonement qui serait absent chez *N. suaveolens*,

3) ou bien les deux espèces possèdent les mêmes facteurs, mais les tissus de *N. glauca* sont plus sensibles aux inhibiteurs de bourgeonnement que ceux de *N. suaveolens*.

Ces trois hypothèses différentes nous ont conduit aux expériences qui suivent.

C. ACTION DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES ET DE LEURS ANALOGUES

Le caractère génétique de la propension au bourgeonnement que suggèrent les expériences précédentes, de même que les résultats obtenus antérieurement avec la *Cardamine* (Paulet et Nitsch, 1959 ; Paulet, 1960), nous ont conduit à penser que ce phénomène était lié à la capacité de synthèse et aux fonctions des acides nucléiques. Nous avons donc étudié l'action des bases puriques et pyrimidiques et de leurs analogues sur le bourgeonnement des fragments de tige de *Nicotiana suaveolens* et de *N. glauca*. Aucun des produits étudiés n'a causé l'apparition de bourgeons chez *N. glauca*. Par contre, ils ont stimulé, à des degrés divers, la formation de bourgeons sur les cultures de *N. suaveolens*.

Les expériences ont donné des résultats semblables, que les produits aient été autoclavés ou stérilisés par filtration (tableau VII). Dans ce qui va suivre nous ne présenterons, dans la plupart des cas, qu'une série de résultats, obtenue avec des produits stérilisés par filtration et représentative d'autres expériences similaires.

1) Bases puriques des acides nucléiques. — Les bases puriques qui entrent dans la composition des acides nucléiques, l'adénine et la guanine, ont été ajoutées aux milieux à différentes concentrations. Les résultats (tableau VII) montrent que ces deux corps ont stimulé nettement la formation des bourgeons. L'optimum de concentration se place aux alentours de 10^{-5} *M* pour l'adénine et de 10^{-4} *M* pour la guanine. Remarquons que ces mêmes valeurs avaient été trouvées pour les concentrations de guanine

et d'adénine produisant le maximum de bourgeons sur le test Cardamine (Paulet et Nitsch, 1959).

TABLEAU VII

Effet des bases puriques sur le bourgeonnement de Nicotiana suaveolens. *Comparaison des modes de stérilisation.*

Résultats obtenus après 3 semaines de culture.

Milieux (Milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :	
	total	avec bourg.	%	total	pour 10 cultures
Témoins	10	4	**40**	4	**4**
Stérilisation par filtration :					
Adénine 10^{-7} *M*	11	7	**63**	26	**23**
10^{-6} *M*	10	7	**70**	29	**29**
10^{-5} *M*	10	7	**70**	42	**42**
10^{-4} *M*	10	7	**70**	23	**23**
Guanine 10^{-6} *M*	11	9	**81**	30	**27**
10^{-5} *M*	10	10	**100**	35	**35**
10^{-4} *M*	10	10	**100**	65	**65**
Stérilisation par autoclavage :					
Adénine 10^{-7} *M*	12	11	**91**	31	**26**
10^{-6} *M*	12	11	**91**	37	**30**
10^{-5} *M*	12	12	**100**	48	**40**
10^{-4} *M*	11	8	**72**	23	**20**
Guanine 10^{-6} *M*	11	7	**63**	20	**18**
10^{-5} *M*	12	10	**83**	31	**26**
10^{-4} *M*	12	12	**100**	52	**44**

2) Bases pyrimidiques des acides nucléiques. — Le Tableau VIII donne les résultats obtenus avec les bases pyrimidiques des acides nucléiques employées individuellement à diverses concentrations. Ici encore tous les composés employés ont stimulé le bourgeonnement, mais à des degrés divers. Ainsi la cytosine s'est montrée, relativement, la moins active, et la thymine la plus active. L'optimum de concentration se place aux alentours de 10^{-6} *M* pour la cytosine et l'uracile, aux alentours de 10^{-7} *M* pour la thymine. Ici encore, ces optimums coïncident pratiquement avec ceux trouvés pour le bourgeonnement de *Cardamine pratensis*.

TABLEAU VIII

Action des bases pyrimidiques sur le bourgeonnement de fragments de tiges de Nicotiana suaveolens.

Résultats après 3 semaines de culture

Milieux (Milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures : total	avec bourg.	%	Nombre de bourgeons : total	pour 10 cultures
Témoins	12	4	**33**	9	**7**
Cytosine 10^{-7} *M*	12	9	**75**	26	**21**
10^{-6} *M*	12	9	**75**	45	**37**
10^{-5} *M*	12	10	**83**	38	**31**
Thymine 10^{-7} *M*	12	12	**100**	64	**53**
10^{-6} *M*	12	11	**91**	55	**46**
10^{-5} *M*	12	11	**91**	50	**41**
Uracile 10^{-7} *M*	11	10	**90**	38	**34**
10^{-6} *M*	12	11	**91**	60	**50**
10^{-5} *M*	12	10	**83**	40	**33**

TABLEAU IX

Action des acides inosinique et orotique sur le bourgeonnement de fragments de tiges de Nicotiana suaveolens.

Résultats obtenus après 1 mois de culture

Milieux (milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures : total	avec bourg.	%	Nombre de bourgeons : total	pour 10 cultures
Témoin	11	11	**100**	44	**40**
Acide inosinique 10^{-6} *M*	12	12	**100**	42	**35**
10^{-5} *M*	10	10	**100**	33	**33**
10^{-4} *M*	12	12	**100**	45	**38**
10^{-3} *M*	12	12	**100**	48	**40**
Témoin	12	12	**100**	38	**32**
Acide orotique 3×10^{-5} *M*	12	11	**92**	42	**35**
3×10^{-4} *M*	12	12	**100**	45	**38**
3×10^{-3} *M*	12	12	**100**	51	**43**
Témoin	11	7	**63**	40	**36**
Acide orotique 3×10^{-3} *M*	12	12	**100**	90	**75**

Une expérience faite avec les mélanges :

adénine	adénine
guanine	guanine
cytosine et	cytosine
thymine	uracile

a montré un accroissement important du bourgeonnement sans pouvoir distinguer l'action prédominante de l'un ou de l'autre groupe.

3) Précurseurs immédiats des bases puriques et pyrimidiques. — Les travaux antérieurs sur la Cardamine (Paulet et Nitsch, 1959) ont montré que des précuresurs des purines, comme le glycocolle, ou des pyrimidines, comme l'acide orotique, stimulaient la néoformation de bourgeons. Dans la présente étude, nous nous sommes borné à essayer deux précurseurs immédiats, l'un des purines, l'acide inosinique, l'autre des pyrimidines, l'acide orotique. Les résultats du Tableau IX montrent que l'acide inosinique n'a pas augmenté le nombre (déjà élevé chez les témoins) de bourgeons formés par les cultures de tige de *Nicotiana suaveolens*. Par contre, l'acide orotique a renforcé l'intensité du bourgeonnement, comme il l'avait fait avec la Cardamine.

4) Analogues des bases puriques et pyrimidiques. — Un autre moyen de mettre en lumière le rôle des bases puriques dans les phénomènes du bourgeonnement est de bloquer les mécanismes dans lesquels elles entrent par des corps analogues du point de vue chimique mais qui ne peuvent effectuer les mêmes fonctions physiologiques. Si ces antimétabolites bloquent le bourgeonnement et si l'addition d'un excès de la base mise en cause lève l'inhibition, on peut raisonnablement penser que cette base joue un rôle essentiel dans le processus du bourgeonnement.

Nous avons employé deux analogues des bases puriques, la 6-mercaptopurine et la 8-azaguanine, qui agissent au niveau de l'acide ribonucléique (ARN). Il a été démontré, par exemple, que la 8-azaguanine est incorporée dans l'ARN de *Tetrahymena geleii* et que cet effet est empêché par l'addition de guanine (Heinrich et coll., 1962). Nous avons aussi employé un analogue de l'uracile, le 5-bromouracile qui est incorporé dans l'acide desoxyribonucléique (ADN) à la place de la thymine, par exemple dans une préparation enzymatique faite à partir d'*Escherichia coli* (Bessman et coll., 1958). Enfin nous avons essayé le 5-fluorouracile qui, incorporé en place de l'uracile, perturbe la synthèse des protéines et des acides nucléiques, comme l'ont montré les expériences de Bonner et Zeevaart (1962) sur le *Xanthium*.

Les résultats obtenus avec ces inhibiteurs sont consignés dans les Tableaux X et XI. On voit que la 6-mercaptopurine et, surtout, la 8-azaguanine à 10^{-4} *M* réduisent de façon drastique

le nombre de bourgeons formés après un mois de culture, sans pour cela inhiber la formation des cals. L'addition de guanine (3×10^{-4} *M*) supprime complètement l'inhibition.

TABLEAU X

Action de deux analogues des bases puriques sur le bourgeonnement de fragments de tige de Nicotiana suaveolens.

Résultats obtenus après 1 mois de culture

Milieux (milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :	
	total	avec bourg.	%	total	pour 10 cultures
Témoin	11	7	**63**	40	**36**
6-mercaptopurine 10^{-4} *M*	12	7	**58**	12 (cals normaux)	**10**
6-mercaptopurine 10^{-4} *M* + guanine 3×10^{-4} *M*	10	10	**100**	48	**48**
guanine 3×10^{-4} *M*	11	9	**81**	38	**34**
8-azaguanine 10^{-4} *M*	10	2	**20**	6 (cals normaux)	**6**
8-azaguanine 10^{-4} *M* + guanine 3×10^{-4} *M*	11	6	**54**	39	**37**

La 5-bromouracile a aussi inhibé le bourgeonnement aux concentrations de 10^{-5} *M* et de 10^{-4} *M*, mais les cals étaient parfaitement normaux. L'addition de thymidine n'a pas pu réverser cette inhibition, peut-être à cause de la concentration trop élevée, puisque la thymidine seule, à 3×10^{-4} *M*, s'est montrée inhibitrice.

Enfin, l'effet inhibiteur du 5-fluorouracile sur le bourgeonnement à 10^{-5} *M* et 10^{-4} *M* n'a pu être réversé par la thymine (tableau XII), mais, au moins partiellement, par l'acide orotique (tableaux XI et XII), précurseur à la fois des pyrimidines de l'ADN et de l'ARN, qui, employé seul, s'est montré extrêmement stimulateur du bourgeonnement. A la concentration de 10^{-3} *M*, par contre, le 5-fluorouracile a inhibé non seulement le bourgeonnement, mais aussi le développement des cals sur les explantats.

TABLEAU XI

Action de deux analogues des bases pyrimidiques sur le bourgeonnement de fragments de tige de Nicotiana suaveolens.

Résultats obtenus après 1 mois de culture.

Milieux (Milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures : total	avec bourg.	%	Nombre de bourgeons : total	pour 10 cultures
1re *expérience* : 5 *bromouracile* (5-*BU*) *et* 5-*fluorouracile* (5-*FU*) :					
Témoin	11	7	**63**	40	**36**
5-bromouracile 10^{-5} *M*	12	7	**58**	20	**16**
10^{-4} *M*	10	5	**50**	15	**15**
5-BU 10^{-4} *M* + thymidine 3×10^{-4} *M*	10	7	**70**	(cals normaux) 18	**18**
Thymidine 3×10^{-4} *M*	11	5	**45**	15	**12**
5-Fluorouracile 10^{-5} *M*	12	10	**83**	42	**35**
10^{-4} *M*	12	8	**66**	26	**21**
10^{-3} *M*	12	0	**0**	0	**0**
5-FU 10^{-5} *M* + ac. orotique 3×10^{-5} *M*	11	10	**90**	(pas de cals) 24	**21**
5-FU 10^{-4} *M* + ac. orotique 3×10^{-4} *M*	12	12	**100**	37	**30**
5-FU 10^{-3} *M* + ac. orotique 3×10^{-3} *M*	12	0	**0**	0	**0**
Ac. orotique 3×10^{-3} *M*	12	12	**100**	(cals normaux) 90	**75**
2e *expérience* : 5 *fluorouracile* (5-*FU*) :					
Témoin	12	12	**100**	38	**32**
5-fluorouracile 10^{-5} *M*	11	11	**100**	29	**26**
10^{-4} *M*	12	11	**92**	27	**23**
10^{-3} *M*	12	0	**0**	0	**0**
5-FU 10^{-5} *M* + ac. orotique 3×10^{-5} *M*	12	12	**100**	(pas de cals) 40	**33**
5-FU 10^{-4} *M* + ac. orotique 3×10^{-4} *M*	11	11	**100**	54	**49**
5-FU 10^{-3} *M* + ac. orotique 3×10^{-3} *M*	11	0	**0**	0	**0**
Acide orotique 3×10^{-5} *M*	12	11	**92**	(cals normaux) 42	**35**
3×10^{-4} *M*	12	12	**100**	45	**38**
3×10^{-3} *M*	12	12	**100**	51	**43**

TABLEAU XII

Réversion des effets inhibiteurs du 5-fluorouracile sur la formation de bourgeons et le développement de cals chez des fragments de tige de Nicotiana suaveolens.

Résultats obtenus après 1 mois de culture

Milieux (milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures :			Nombre de bourg. :		Aspect de cals
	total	avec bourg.	%	total	pour 10 cultures	
Témoin	11	11	**100**	58	**53**	Normaux
5-Fluorouracile 10^{-4} *M*	12	4	**33**	4	**3**	Mal formés
id. + cytosine 3 × 10^{-4} *M*	12	1	**8**	7	**6**	Mal formés
id. + thymine 3 × 10^{-4} *M*	12	0	**0**	0	**0**	Pratiquement inexistants
id. + uracile 3 × 10^{-4} *M*	12	2	**16**	9	**8**	Normaux
id. + ac. orotique 3 × 10^{-4} *M*	12	2	**16**	15	**13**	Normaux et vigoureux
id. + ac. orotique 10^{-3} *M*	12	10	**83**	24	**20**	Normaux et vigoureux
Cytosine 3 × 10^{-4} *M*	11	9	**82**	65	**59**	Normaux
Thymine 3 × 10^{-4} *M*	12	9	**75**	40	**33**	Normaux
Uracile 3 × 10^{-4} *M*	12	11	**92**	37	**31**	Normaux
Ac. orotique 3 × 10^{-4} *M*	12	9	**82**	40	**33**	Normaux
Ac. orotique 10^{-3} *M*	12	8	**67**	9	**8**	Normaux

5) Action différentielle sur la formation de cals et celle de bourgeons. — Le 5-bromouracile, à la concentration de 10^{-4} *M*, a réduit fortement la production de bourgeons sans pour autant inhiber le développement de cals aux extrémités des fragments de tiges mis en culture. A la même concentration molaire, le 5-fluorouracile, au contraire, a inhibé *à la fois* la néoformation de bourgeons et le développement des cals. L'inhibition a été totale pour 10^{-3} *M* de 5-fluorouracile. L'addition d'uracile ou d'acide orotique, mais non celle de thymine ou de cytosine (tableau XII), a permis de réverser l'inhibition exercée sur la formation des cals, mais non pas (ou du moins très imparfaitement) celle exercée sur la néoformation des bourgeons. La fig. de la Pl. III, en particulier, montre qu'une concentration élevée (10^{-3} *M*) de 5 fluorouracile inhibe totalement le développement de cals : ligne 4. L'adjonction d'une concentration 3 fois plus forte d'acide orotique lève l'inhibition exercée sur la formation du cal, mais non celle exercée sur le bourgeonnement (ligne 7). Ces résultats sont valables dans les conditions de nos expériences où les bourgeons ont été comptés 3-4 semaines après la mise en culture. Si l'on attend plus longtemps, des bourgeons finissent par apparaître sur les séries contenant à la fois le 5-fluorouracile et l'acide orotique.

6). Conclusions. — Les expériences mettant en jeu l'apport de bases puriques et pyrimidiques au milieu de culture ont montré une action stimulatrice à faible dose (10^{-7} *M*) de la thymine plus prononcée que celle des autres purines et pyrimidines qui entrent dans la composition des acides nucléiques. La thymine étant un constituant spécifique de l'ADN, et la néoformation de bourgeons étant un processus de multiplication cellulaire, il n'est pas étonnant que les résultats expérimentaux mettent en relief le rôle de cette pyrimidine.

L'action des analogues, tels que le 5-bromouracile et le 5-fluorouracile, montre que les troubles de la synthèse des acides nucléiques interviennent directement sur le bourgeonnement.

L'acide orotique à 3×10^{-3} *M* réverse l'action du 5-fluorouracile à 10^{-3} *M* en ce qui concerne la prolifération cellulaire, puisque les cals se forment ; mais le bourgeonnement reste stoppé, du moins pendant 4 semaines. Il semble donc que le 5-fluorouracile inhibe de façon relativement spécifique la formation des bourgeons.

Les expériences qui viennent d'être décrites doivent être considérées comme préliminaires. L'interprétation des résultats obtenus est d'autant plus difficile que l'on connaît mal, à l'heure actuelle, sinon le point précis où les inhibiteurs employés interfèrent avec l'ADN, l'ARN messager ou la synthèse des protéines, du moins les réactions secondaires que ces corps peuvent produire dans les plantes et qui peuvent masquer les effets primaires.

Cependant, les résultats des tableaux X et XI offrent quelques perspectives intéressantes : ils montrent, en particulier, que la néoformation des bourgeons en présence d'acide orotique (3×10^{-3} *M*) peut être inhibée par le 5-fluorouracile, alors que la croissance du cal ne l'est pas ; ils montrent aussi que l'effet de la 8-azaguanine (10^{-4} *M*), qui réduit fortement la formation des bourgeons, peut être réversé par la guanine (3×10^{-4} *M*). Ces inhibiteurs seront peut-être susceptibles, dans l'avenir, de devenir des clés, grâce auxquelles il sera possible d'aborder le mécanisme du bourgeonnement au niveau moléculaire.

D. - ÉTUDE DES PRINCIPAUX COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES TROIS *NICOTANIA*. LEUR ROLE DANS LE BOURGEONNEMENT

1) Expériences préliminaires : effet d'extraits bruts sur le bourgeonnement. — Après avoir vainement tenté d'extraire de *Nicotiana suaveolens* un facteur provoquant le bourgeonnement de *Nicotiana glauca*, nous avons pensé que, peut-être, *Nicotiana glauca* contenait un principe inhibiteur qui pourrait être mis en évidence en utilisant la propriété des fragments de tiges de *N. suaveolens* de toujours donner des bourgeons.

Pour étudier cette question, nous avons préparé des extraits des deux espèces de *Nicotiana* et de l'hybride et nous les avons incorporés à des milieux sur lesquels ont été plantés des fragments de tige de *N. suaveolens*.

Les premières expériences ont été faites avec des extraits bruts de feuilles des trois types. L'extrait de 50 g (poids de matière fraîche) par litre a provoqué une inhibition générale du bourgeonnement (Pl. IV), sans pour autant inhiber la prolifération des cals. L'intensité de l'inhibition générale du bourgeonnement a d'ailleurs diminué avec le temps, car des bourgeons se sont développés après trois semaines sur un tiers des cultures. Par contre, les cals ont produits des racines, certaines épaisses comme s'il y avait un excès d'auxine. Enfin nous avons constaté un brunissement du milieu au contact des tissus.

2) Identification de la rutine et de l'acide chlorogénique. — Pour déterminer les principes actifs contenus dans les extraits nous avons eu recours à la chromatographie ascendante à une dimension sur grandes feuilles de papier, dans le mélange : *n*-butanol (86) + H_2O (14). Les chromatogrammes ont été découpés en bandes horizontales, et les bandes éluées à l'eau bouillante. Les éluats correspondant à 25 g (poids frais) de feuilles ont ensuite été incorporés aux milieux de culture contenant 1 mg/l d'AIA, après ajustement du pH à 5,5. Les tubes ont été ensemencés avec

TABLEAU XIII

Extrait de Nicotiana glauca. *Propriétés des bandes séparées par chromatographie.*

Extrait de feuilles de *N. glauca*. Chromatographie ascendante sur papier dans *n*-butanol (86) + H_2O (14). Les éluats des diverses bandes (élution à l'eau bouillante) ont été incorporés aux milieux à raison de l'équivalent de 100 g de matière fraîche initiale par litre de milieu. Milieu de base S, 3 % de saccharose, 1 mg/l d'AIA.

Bandes	Rf	Coloration		Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons	
		lumière naturelle	U.V.	total	avec bourg.	%	total	sur 10 cultures
A	0 — 0,15	—	violet	12	10	**83**	23	**20**
B	0,2 — 0,3	—	bleu-violet	12	8	**66**	22	**18**
Interzone	0,3 — 0,5	jaune	—	12	5	**41**	7	**6**
C	0,5 — 0,6	—	bleu (1)	12	4	**33**	5	**4**
D	0,7 — 0,9	devient rouge après irradiation aux U.V	bleu-violet	12	11	**91**	56	**45**
Témoins	—	—	—	11	10	**90**	33	**30**

(1) Devient vert sous l'effet de vapeurs d'ammoniaque.

des tronçons de tige de *N. suaveolens*. Au bout de trois semaines de croissance à la lumière, nous avons relevé le nombre de bourgeons formés.

Les résultats du tableau XIII montrent que la bande C et l'interzone de Rf. 0,3 - 0,5 inhibent de façon particulièrement active la néoformation de bourgeons sur les cultures de *N. suaveolens*. Nous avons cherché à en connaître la nature chimique.

L'interzone non fluorescente de Rf 0,3-0,5 a une teinte jaune à la lumière naturelle, teinte qui vire au brun en présence de vapeurs d'ammoniac. Son spectre d'absorption est comparable à celui donné par Jurd et Horowitz (1957) pour la rutine.

La bande C de Rf 0,5-0,6 produit une vive fluorescence bleue dans l'ultra-violet, fluorescence qui vire au vert en présence de vapeurs d'ammoniac. Son spectre d'absorption est analogue à celui de l'acide chlorogénique (fig. 2) et correspond à celui donné

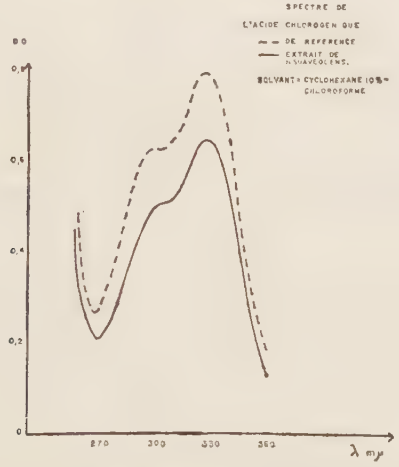


Fig. 2. — Spectre de l'acide chlorogénique de référence (pointillé) et de la bande fluorescente de Rf. 0,5 de l'extrait de tige de *N. suaveolens* chromatographié dans le mélange *n*-butanol (86) + H_2O (14).
En abcisses : longueurs d'onde en mμ ; *en ordonnées* : densité optique.

par Sutherland (1959). Nous pensons qu'il s'agit bien d'acide chlorogénique, les Rf de la bande C et de l'acide chlorogénique étant les mêmes.

La rutine et l'acide chlorogénique constituent d'ailleurs les deux composés phénoliques essentiels de *N. tabacum* (Dawson et Wada, 1957).

3) Action de la rutine et de l'acide chlorogénique sur le bourgeonnement. — Pour vérifier nos conclusions, nous

avons ajouté de l'acide chlorogénique et de la rutine de synthèse à de nouvelles séries de milieux. La Pl. V donne une idée des résultats obtenus. L'acide chlorogénique, à la concentration de 5×10^{-5} *M*, inhibe totalement la formation des bourgeons sur des cultures de *N. suaveolens* pendant les trois premières semaines. Cette inhibition se manifeste même en présence de 1 mg/l de kinétine (ligne AC + K1), laquelle stimule pourtant fortement le bourgeonnement (ligne K1). La rutine à la concentration de 5×10^{-6} *M* produit les mêmes effets que l'acide chlorogénique (lignes RU et RU + K1).

Notons que, comme on le verra plus loin (tableau XVII), l'inhibition du bourgeonnement par la rutine et l'acide chlorogénique ne se produit qu'en présence d'auxine.

4) Etude comparative de quelques composés phénoliques présents dans les tiges des deux espèces de *Nicotania* et de leur hybride.

a) *Absence de différences qualitatives.* — A la suite des expériences qui précèdent, nous avons décidé de voir s'il existait des différences qualitatives dans la composition en dérivés phénoliques des tiges des trois types de *Nicotiana*. Il est plus logique, en effet, d'analyser le contenu de l'organe mis en culture (la tige) que celui des feuilles. Notre but n'était pas d'analyser les composés phénoliques pour les identifier un à un, mais simplement de voir si une espèce possédait un produit qui n'existerait pas chez les autres.

Nous avons donc chromatographié les extraits méthanoliques des tiges jeunes de *N. glauca*, *N. suaveolens* et de leur hybride sur de grandes feuilles de papier dans l'acide formique à 2%.

Révélés aux rayons ultra-violets longs, les chromatogrammes montraient huit bandes que nous avons désignées : A, B,... H. Elles étaient présentes toutes les huit chez chaque espèce ; cependant la bande H, qui semble être constituée par un mélange de glucosides (solubilité importante, réduction du nitrate d'argent et possibilité d'hydrolyse), n'avait pas exactement la même couleur de fluorescence dans les trois types.

b) *Présence de scopolétine dans certains extraits de* N. suaveolens. — Dans nos premières expériences et durant plus de six mois, nous trouvions dans les chromatogrammes de tiges de *N. suaveolens* une bande produisant aux U.V. longs une fluorescence d'un bleu très intense à Rf 0,3, qui n'était pas visible dans le cas des deux autres *Nicotiana*.

Les différentes bandes fluorescentes des chromatogrammes des trois types de *Nicotiana*, éluées à l'eau bouillante et incorporées au milieu de culture en présence d'AIA, inhibaient presque toutes le bourgeonnement des fragments de tiges de *N. suaveolens*. L'éluat

de la zone de Rf 0,3 des chromatrogrammes d'extraits de *N. suaveolens* émettait une fluorescence bleu intense et paraissait stimuler le bourgeonnement :

Témoins..... 9 bourgeons pour 12 cultures.
Bande Rf 0,3 ..... 17 bourgeons pour 12 cultures.

Cette bande, rechromatographiée dans les solvants indiqués au tableau XIV, migrait au Rf de la scopolétine. Son spectre dans l'U.V. était semblable à celui de la scopolétine. Nous pensons donc qu'il s'agit bien de cette substance.

TABLEAU XIV

Propriétés comparatives de la scopolétine et de la substance fluorescente provenant des premiers extraits de feuilles de Nicotiana suaveolens.

Le composé fluorescent de *N. suaveolens*, présent au Rf 0,3 en chromatographie dans l'acide formique à 2 % a été élué et rechromatographié dans les solvants indiqués.

	Composé fluorescent de *N. suaveolens*	Scopolétine
Fluorescence dans l'UV long	bleu intense	bleu intense
Rf dans le mélange : isopropanol (80) + H_2O (20)	0,68	0,67
Rf dans le mélange : acide formique (20) + benzene (60) + isopropanol (10) + H_2O (10)	artefact (?) : 0,08 spot principal : 0,36	artefact (?) : 0,05 spot principal : 0,36

Par la suite, nous n'avons plus retrouvé la scopolétine, ni en utilisant des techniques plus rigoureuses, comme celles de Sargent et Skoog (1960, 1961), ni en hydrolysant les glucosides qui s'accumulent au front des chromatogrammes (bande H). Nous pensons que l'accumulation de scopolétine que nous avons observée était la réponse à une attaque virale que nous n'avions pas décelée, car on sait depuis les travaux de Best (1936, 1944) sur *Nicotiana tabacum*, ceux de Andreae (1949), de Pavillard et Beauchamp (1957), etc. sur la pomme de terre, que ce produit apparaît dans ces Solanées lors d'infections par des virus.

c) *Action de la scopolétine sur le bourgeonnement de* N. suaveolens. — Quoi qu'il en soit, des expériences de contrôle avec de la scopolétine «Fluka» ont montré que, à faible concentration (200 µg/l), soit sensiblement 10^{-6} *M*, et en présence de 250 µg/l d'AIA,

la scopolétine stimule légèrement le bourgeonnement des tiges de *N. suaveolens*, alors qu'à 4000 µg/l elle l'inhibe, même en présence de 100 et 200 µg/l de kinétine (Pl. VI et tableau XV).

d) *Etude quantitative des niveaux d'acide chlorogénique des trois* Nicotiana. — Sur les chromatogrammes, pour un même poids de matériel extrait, l'intensité de fluorescence était plus forte dans le cas de *N. suaveolens*, que dans celui de l'hybride et, surtout, de *N. glauca*. Cette différence était particulièrement nette

TABLEAU XV

Action de la scopolétine sur le bourgeonnement de fragments de tige de Nicotiana suaveolens.

Résultats après 3 semaines de culture.

Milieux (milieu S + AIA, 250 µg/l)	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :	
	total	avec bourg.	%	total	pour 10 cultures
Témoin	11	3	**27**	5	**4**
scopolétine 200 µg/l	12	11	**91**	40	**33**
scopolétine 4000 µg/l	12	0	**0**	0	**0**
kinétine 100 µg/l	12	11	**91**	environ 100	environ **83**
kinétine 200 µg/l	12	12	**100**	200	**200**
scopolétine 200 µg/l + kinétine 100 µg/l	12	12	**91**	environ 100	environ **83**
scopolétine 200 µg/l + kinétine 200 µg/l	12	12	**100**	200	**200**
scopolétine 4000 µg/l + kinétine 100 µg/l	10	0	**0**	0	**0**
scopolétine 4000 µg/l + kinétine 200 µg/l	12	5	**41**	8	**6**

pour la bande E (Rf. 0,5 environ), celle qui correspond à l'acide chlorogénique.

Nous avons donc déterminé quantitativement les doses d'acide chlorogénique présentes dans les tiges des trois *Nicotiana* (voir Techniques). Sachant que l'acide chlorogénique inhibe le bourgeonnement en présence d'auxine et que c'est *N. suavoelens* qui bourgeonne le plus facilement, on aurait pu penser que cette espèce est la plus pauvre en cette substance. Or les dosages ont montré qu'il n'en était rien et que c'était précisément *N. suaveolens* qui contenait le plus d'acide chlorogénique (Tableau XVI et fig. 3).

TABLEAU XVI

Teneurs en acide chlorogénique des tissus de tiges de Nicotiana suaveolens, N. glauca *et leur hybride.*

Espèce	Teneurs en acide chlorogénique :		
	mg/gr. mat. frais	mg/gr. mat. sec	mol./gr. mat. frais
N. *suaveolens*	0,56	6,0	$1,7 \times 10^{-6}$
Hybride	0,18	3,2	$0,6 \times 10^{-6}$
N. glauca	0,17	2,4	$0,5 \times 10^{-6}$

e) *Nécessité de la présence d'auxine pour que l'acide chlorogénique inhibe le bourgeonnement.* - L'inhibition du bourgeonnement par les composés phénoliques nous semblait liée, lors de nos premières expériences, à la présence d'auxine dans le milieu. On sait, en effet, que ces composés renforcent ou réduisent l'effet de l'AIA suivant la nature de leur molécule, comme l'ont montré les expériences de Nitsch et Nitsch (1959, 1961) sur le test «mésocotyle ». La rutine et l'acide chlorogénique, en particulier, exaltent fortement l'effet stimulateur de l'AIA sur l'élongation des segments de mésocotyles.

Nous avons donc réalisé diverses expériences avec des fragments de tiges soit de *N. suaveolens*, soit de l'hydride. L'acide chlorogénique n'inhibait pas le bourgeonnement à des doses d'environ 10^{-6} *M* lorsque nous n'ajoutions aucune auxine aux milieux de culture. Par contre, lorsque les milieux contenaient de l'AIA (à la dose de 1 mg/l généralement), l'addition d'acide chlorogénique supprimait tout bourgeonnement. Des résultats obtenus avec des fragments de tiges de l'hybride sont consignés dans le tableau XVII et illustrés par la Pl. VII. On voit que, en l'absence d'auxine, 10^{-6} *M* d'acide chlorogénique non seulement ne diminue pas le bourgeon-

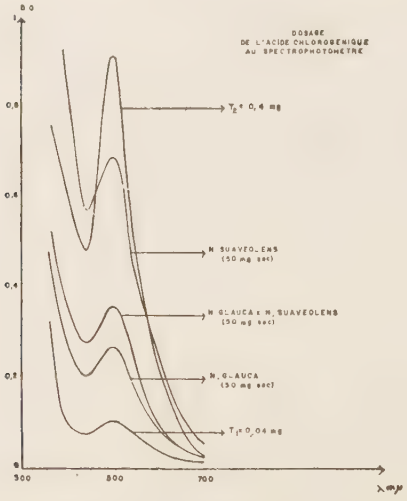


Fig. 3. — Spectre d'absorption en lumière visible du composé rouge formé lors de la réaction de Hoepfner, soit avec l'acide chlorogénique de référence (T_1 et T_2), soit avec l'acide chlorogénique extrait de 50 mg de tissus de tige (matériel sec) des trois *Nicotiana*.

TABLEAU XVII

Action de l'acide chlorogénique, seul et en présence d'auxine, sur le bourgeonnement de l'hybride N. suaveolens × N. glauca.

Résultats après 1 mois de culture

Milieux (milieu S + 3 % saccharose)	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :	
	total	avec bourg.	%	total	pour 10 cultures
A. *Série sans auxine* :					
Témoins	10	10	**100**	60	**60**
+ acide chlorogénique 10^{-6} *M*	10	10	**100**	70	**70**
10^{-5} *M*	10	9	**90**	45	**45**
10^{-4} *M*	10	9	**90**	38	**38**
10^{-3} *M*	10	8	**80**	35	**35**
B. *Série avec auxine* : (AIA : 1 mg/l = $5{,}7 \times 10^{-6}$ *M*)					
Témoins	12	2	**17**	6	**5**
+ acide chlorogénique 10^{-6} *M*	12	0	**0**	0	**0**
10^{-5} *M*	11	0	**0**	0	**0**

nement spontané, mais encore l'augmente légèrement. De fait, même une concentration d'acide chlorogénique 1000 fois plus forte (10^{-3} *M*) est encore incapable de supprimer tout bourgeonnement, bien qu'elle le réduise. Par contre en présence d'1 mg/l d'AIA, la plus faible concentration (10^{-6} *M*) d'acide chlorogénique a empêché toute néoformation de bourgeons. On peut en conclure, et les résultats obtenus avec l'endive (voir tableau XXVI) vont confirmer cette conclusion, que : *l'inhibition du bourgeonnement est bien due au renforcement de l'action de l'auxine par l'acide chlorogénique.*

f) *Conclusions.* — En résumé, nous pouvons dire que, si la composition en dérivés phénoliques des deux *Nicotiana* et de leur hybride est pratiquement la même du point de vue qualitatif, nous avons pu mettre en évidence une différence quantitative, en ce qui concerne l'acide chlorogénique. Cependant le sens de cette différence va à l'encontre de ce que l'on pourrait présumer, car c'est *Nicotiana suaveolens* qui contient le plus d'acide chlorogénique, devant l'hybride et, ensuite, *N. glauca.*

A la suite de ces résultats l'étude de la composition en auxine des trois *Nicotiana* s'imposait.

E. — EFFET DE L'AUXINE SUR LE BOURGEONNEMENT. ÉTUDE DES SUBSTANCES DE CE TYPE CONTENUES DANS LES TROIS *NICOTIANA*

1) Introduction. — L'action inhibitrice des auxines sur la néoformation des bourgeons est bien connue (voir, par exemple, Gautheret, 1959). Quelques auteurs, cependant, tels que Stichel (1958) et Wurm (1960), ont pensé avoir observé un effet stimulateur d'une auxine synthétique, l'acide α-naphtalène-acétique, sur la néoformation de bourgeons par des cultures de Cyclamen. Pour savoir à quoi nous en tenir, en ce qui concerne les tissus de tige de *N. suaveolens*, nous avons ensemencé des tronçons sur le milieu S additionné d'une gamme de concentrations d'AIA. Les résultats (fig. 4) ont été clairs : toute addition d'auxine aux milieux, même à des doses extrêmement faibles, telles que 10^{-10} *M*, soit moins de 0,02 µg/litre, réduit le nombre de bourgeons formés.

D'autre part, les dosages de l'auxine naturellement présente dans les tissus au cours de la régénération de bourgeons ont toujours indiqué qu'une baisse du niveau de ces substances précédait l'apparition des bourgeons (Camus, 1949 ; Warmke et Warmke 1950 ; Vardjan et Nitsch, 1961). Nous nous sommes demandé si la différence, si nette, observée dans la tendance au bourgeonnement entre *N. suaveolens* et *N. glauca*, ne provenait pas d'un niveau plus bas d'auxine endogène chez *N. suaveolens*. Cette hypo-

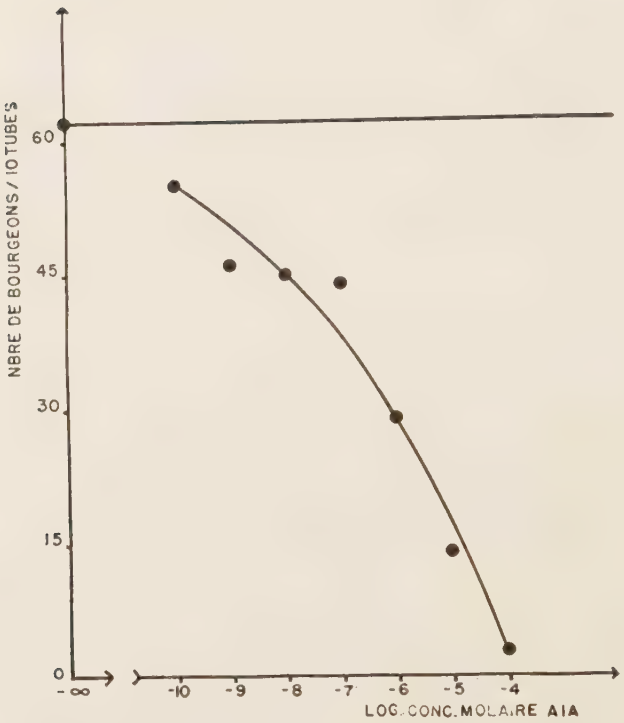


Fig. 4. — Effet de l'incorporation d'acide 3-indolylacétique (AIA) au milieu de culture S sur la néoformation de bourgeons par des tronçons de tiges de *N. suaveolens*. Résultats observés après trois semaines de culture. *En abcisses* : logarithmes des concentrations molaires d'AIA. *En ordonnées* : nombre de bourgeons formés sur 10 cultures.

thèse de travail nous a conduit à étudier les auxines des trois types de *Nicotiana*. L'emploi de la méthode biochromatographique de Nitsch et Nitsch (1955) nous a permis d'étudier comparativement ces substances à la fois sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif.

Après un essai préliminaire, nous avons opéré sur des extraits méthanoliques de 25 mg de tiges jeunes. La fig. 5, qui correspond à l'une de ces expériences, permet de comparer plus facilement les résultats obtenus.

2) Absence de différences qualitatives nettes. — Du point de vue qualitatif, les pics d'activité visibles sur les histogrammes sont généralement les mêmes pour les trois *Nicotiana*.

Ces pics sont les suivants :

A : Rf..... 0,025-0,075
B : Rf..... 0,175-0,225

C : Rf..... 0,325-0,375
D : Rf..... 0,625-0,675
E : Rf..... 0,725-0,775
F : Rf..... 0,875-0,925

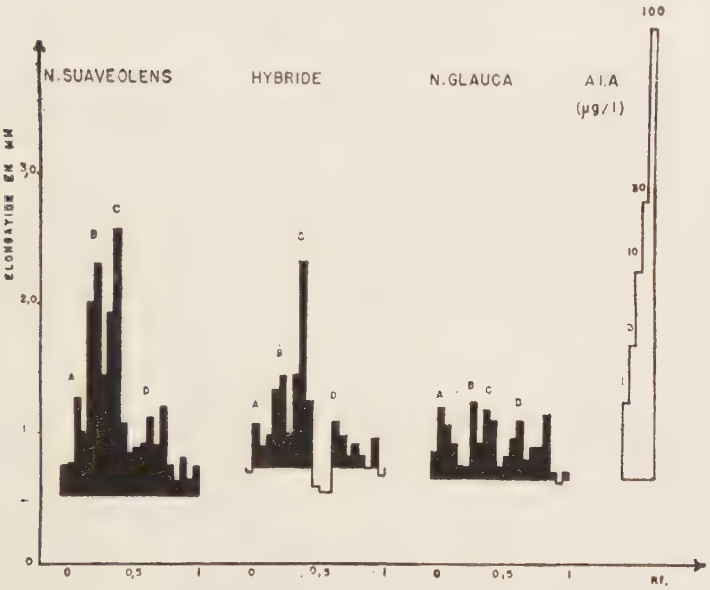


Fig. 5. — Histogrammes indiquant l'activité, sur le test « mésocotyle », des diverses régions des chromatogrammes d'extraits de tige de *N. suaveolens*, *N. glauca* et leur hybride.
En abcisses : Rf. *En ordonnées* : élongation moyenne de 10 segments de « mésocotyles ».

On voit sur la fig. 5 que tous les pics principaux (A, B, C, D) se retrouvent chez les trois *Nicotiana*. Il pourrait exister quelques différences chez les pics de Rf plus élevés, mais les résultats obtenus ne sont pas assez détaillés sur ce point.

3) Identité probable des pics principaux B et C. — Sans chercher à identifier chimiquement de façon indiscutable les diverses substances que nous avons séparées par chromatographie, ce qui eût nécessité une étude spéciale de longue haleine, nous avons néanmoins voulu obtenir une idée de la nature possible de ces composés. Dans ce but nous avons fait quelques réactions colorées sur les chromatogrammes et étudié l'activité biologique des zones actives sur un autre test, le test « maïs nain », spécifique des gibbérellines.

Le test d'Ehrlich (1) a produit, à l'emplacement des pics B et C, la coloration violette caractéristique des composées indoliques. Les résultats obtenus avec le test « maïs nain » de Phinney se trouvent consignés dans le tableau XVIII. Ils indiquent une activité de gibbérelline au niveau du pic « B ».

TABLEAU XVIII

Activité des zones B et C des extraits de tiges de N. suaveolens *sur le test maïs nain « Dwarf 3 ».*

Traitement (*a*)	Somme des longueurs 1re gaine + 2e gaine (en cm) (*b*)
Maïs normaux	18,31 ± 1,93 (*c*)
Maïs nains :	
« Tween 80 » à 0,1 % (témoins)	6,91 ± 0,68
AG : 0,01 µg/ml	6,76 ± 0,85
AG : 0,1 µg/ml	9,05 ± 1,10
Eluat de la Zone B : éq. 200 mg matériel sec	9,06 ± 1,38
Eluat de la Zone C : éq. 200 mg matériel sec	5,70 ± 0,65

(*a*) 0,1 ml par plantule de solution aqueuse contenant 0,1 % de « Tween 80 ».

(*b*) Chaque chiffre est la moyenne de 10 plantules mesurées une semaine après le traitement.

(*c*) Intervalle de confiance des moyennes pour un coefficient de sécurité de 95 %.

Ces résultats ont été rapprochés, d'une part, des réactions produites par des composés connus, le tryptophane, l'AIA et l'acide gibbérellique (GA_3), d'autre part des résultats obtenus par Nitsch et Nitsch (1965 a) avec deux autres *Nicotiana*. Le tableau XIX donne un résumé général de cette comparaison.

On peut en conclure que le pic « B » correspond probablement à plusieurs substances superposées, dont le tryptophane et une gibbérelline, alors que le pic « C » pourrait correspondre à l'AIA. Il n'est pas exclu que les composés actifs des zones « B » et « C » soient de même nature dans les cas de *N. suaveolens* et de « Maryland Mammoth ».

(1) Réactif d'Ehrlich (1903) modifié pour chromatographie :

p-diméthylaminobenzaldéhyde	2 g
H_2O	14 ml
HCl concentré	86 ml
Ethanol absolu	400 ml

TABLEAU XIX

Propriétés des zones B et C des chromatogrammes d'extraits de Nicotiana suaveolens. *Comparaison avec les zones B et C d'extraits de* N. tabacum var. « *Maryland Mammoth* » (Nitsch et Nitsch, 1965 a).

Propriétés	Zone B			Zone C			
	N. suaveolens	M. Mammoth (1)	Tryptophane	*N. suaveolens*	M. Mammoth (1)	AIA	GA_3
1. Chromatographie sur Whatman 3 MM dans le mélange : isopropanol (80) + ammoniaque (0,05) + H_2O (20) — Rf :	0,15-0,25	0,15-0,25	0,22	0,35-0,40	0,30-0,45	0,35	0,50
2. Coloration au réaction d'Ehrlich (2) :	violet	violet	violet	violet		violet	0
3. Coloration au réactif de Gordon et Weber (3) :	jaune-brun	jaune	jaune	?	orange sale	rose	0
4. Coloration à la ninhydrine :	?	violet pâle	violet	?	lie de vin	0	0
5. Activité sur le test mésocotyle:	+ + +	+ +	+ +	+ + +	+ +	+ +	+ +
6. Activité sur le maïs « dwarf-3 »:	+ +	+ +	0?	0	+	0	+ +

(1) Résultats de Nitsch et Nitsch (1965 a).
(2) Réactif d'Ehrlich : *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (2 g) + H_2O (14 ml) + HCl conc. (86 ml) + éthanol (400 ml).
(3) Réactif de Gordon et Weber : H_2O (50 ml) + acide perchlorique à 70 % (50 ml) + $FeCl_3$, 6 H_2O (270 mg) — éthanol (100 ml).

1) Différences quantitatives dans les niveaux de substances actives sur le test mésocotyle. — L'intensité de la coloration violette produite par le réactif d'Ehrlich au niveau des zones « B » et « C » a toujours été plus grande dans le cas des extraits de *N. suaveolens*. Les tests biologiques quantitatifs ont également accusé une plus grande activité de ces zones (voir fig. 5). Nous avons groupé dans le tableau XX les résultats obtenus pour la zone C des chromatogrammes au cours de 5 expériences différentes. Ils montrent que, contrairement à ce que l'on pourrait attendre, ce sont les tissus de *N. suaveolens* qui sont les plus riches en auxine C, ceux de *N. glauca* étant les plus pauvres ; les tissus de l'hydride contiennent une concentration d'auxine intermédiaire entre celles des parents.

TABLEAU XX

Comparaison des niveaux de facteur « C » dans les tissus de tige des trois Nicotiana.

I. — Résultats bruts des tests « mésocotyles » :

Date des tests	Concentration du facteur « C » exprimé en µg d'AIA pour 100 mg de matériel sec.		
	N. suaveolens	Hybride	*N. glauca*
16-1-63	38,4	<8	66,8
15-11-63	90,2	206,6	31,8
31-12-63	96,4	54,4	<8
6-1-64	248,0	241,2	78,8
30-6-64	238,0	97,2	35,2
Sommes :	711,0	607,4	220,6
Moyennes :	142	121,4	44,1

II. — Concentrations moyennes du facteur « C » dans les trois *Nicotiana* :

Espèce	Equivalents AIA exprimés en :		
	µg/100 g. sec	µg/kg frais	moles/kg frais
N. suaveolens	142	131	74×10^{-8}
Hybride	121,4	61	34×10^{-8}
N. glauca	44,1	31	17×10^{-8}

5) Conclusions. — Les recherches sur les substances de croissance endogènes actives sur le test mésocotyle ont montré que :

(*a*) le nombre et la position des pics d'activité biologique séparés par chromatographie sur papier sont sensiblement les mêmes pour les trois *Nicotiana* ; il est donc difficile d'expliquer les différences d'aptitude au bourgeonnement par des différences qualitatives dans ces substances de croissance ;

(*b*) il existe bien des différences quantitatives entre les trois *Nicotiana*, mais elles semblent aller à l'opposé de ce que l'on pourrait attendre ; en effet, puisque l'auxine tend à inhiber le bourgeonnement, on aurait pu penser que les tiges qui ne bourgeonnent pas, celles de *N. glauca*, en contiennent plus que celles de *N. suaveolens* qui bourgeonnent abondamment. Or c'est le contraire qui se produit, celles de *N. glauca* contenant environ trois fois moins de facteur « C » que celles de *N. suaveolens*.

Notons cependant que *N. suaveolens* contient plus de facteur « B » que *N. glauca*. Or dans la zone B se trouve une gibbérelline qui pourrait stimuler le bourgeonnement, comme le fait l'AG sur les disques de feuilles de *Cardamine pratensis* (Paulet et Nitsch, 1959). Nous avons donc éprouvé l'activité d'un éluat de la zone B sur le bourgeonnement, d'une part, de *N. suaveolens*, d'autre part, de *N. glauca*. Ajouté au milieu après stérilisation par filtration, à une dose correspondant à 2 g de matière sèche par litre de milieu, l'éluat de la zone B a fait passer le nombre de bourgeons des cultures de *N. suaveolens* de 40 (pour 12 cultures) à 54. Par contre, cette même concentration a été incapable de faire bourgeonner des cultures de *N. glauca* (sur milieu S avec 3% de saccharose et 1 mg/l d'AIA).

F - EFFET DES CYTOKININES SUR LE BOURGEONNEMENT DES TROIS *NICOTIANA*

Le terme de « cytokinine » vient d'être proposé par Skoog Strong et Miller (1965) pour remplacer le mot « kinine » par lequel ces auteurs avaient désigné les composés à effets analogues à ceux de la kinétine. Le mot « kinine » prêtait à confusion car il est employé en biologie animale pour désigner des corps tout à fait différents des cytokinines végétales.

1) Introduction. — Selon la théorie de Skoog, le bourgeonnement est régi par un équilibre entre les auxines, d'une part, et les cytokinines, d'autre part. Lorsque la balance penche en faveur des auxines, les tissus ont tendance à produire des racines ; lorsqu'elle penche en faveur des cytokinines, ils ont tendance à produire des bourgeons ; quand les deux tendances s'opposent exactement, on n'obtient que des cals.

Au cours des analyses qui précèdent, nous avons montré que, loin de contenir moins d'auxines ou moins de facteurs qui exaltent l'effet de l'auxine (comme l'acide chlorogénique ou la rutine), les tissus qui bourgeonnaient vigoureusement, ceux de la tige de *N. suaevolens*, contenaient en réalité plus d'auxine et plus de corps à effets synergiques que les tissus de *N. glauca* qui ne bourgeonnaient pas.

Il était donc nécessaire de savoir si l'autre côté de l'équilibre conduisant au bourgeonnement, constitué par les cytokinines, n'allaient pas, lui, apporter l'explication de la différence de comportement observée entre les trois *Nicotiana*. Les travaux de Vardjan et Nitsch (1961) ont montré que, en effet, des tissus qui bourgeonnent facilement (comme ceux de l'endive) contiennent de fortes teneurs en cytokinines et que, au cours des phénomènes de régénération, une brusque montée du niveau des cytokinines endogènes a lieu au pôle où se formeront les bourgeons, quelques jours avant leur différenciation.

2) Extraction, purification et chromatographie des cytokinines de *Cichorium intybus* et de *Taraxacum officinale*. — Avant de passer aux *Nicotiana*, nous avons voulu améliorer les techniques d'extraction et de purification des cytokinines naturelles en nous adressant à des matériels qui bourgeonnaient abondamment et chez lesquels des cytokinines avaient déjà été mises en évidence (Vardjan et Nitsch, 1961) : les racines d'endive et de pissenlit.

Les méthodes qui font appel aux résines échangeuses d'ions pouvant conduire à des « artéfacts » (voir Zwar et coll., 1963), nous avons employé une technique mise au point par Nitsch (voir Nitsch et Nitsch, 1959, 1965 *b* et *c*) qui consiste à adsorber les cytokinines sur charbon actif en milieu aqueux, puis à les éluer avec divers solvants, le méthanol absolu en particulier.

Une expérience préliminaire nous a montré qu'après une élution au méthanol absolu, la pyridine n'éluait pratiquement plus de composés actifs. Nous avons donc travaillé sur les éluats méthanoliques.

Les éluats obtenus après action du méthanol sur la fraction retenue par le charbon actif ont été ensuite chromatographiés sur grandes feuilles de papier Whatman n° 1 dans le mélange : butanol secondaire (85) + H_2O (15), en chromatographie ascendante. Les chromatogrammes ont été ensuite examinés aux U.V. courts qui ont révélé les bandes d'absorption suivantes :

a) extrait de *Taraxacum* : 4 bandes :

1 : Rf 0,1 à 0,3
2 : Rf 0,5 à 0,6
3 : Rf 0,75 à 0,9

1 : Rf 0,9 à 1.

b) extrait de *Cichorium* : 2 bandes :

1 : Rf 0,2 à 0,35.

2 : Rf 0,7 à 0,85.

Ces bandes ont été découpées, éluées au méthanol, le méthanol évaporé à sec et les résidus repris par l'eau distillée pour être incorporés aux milieux sur lesquels nous avons ensemencé des fragments calibrés de moëlle de tabac « Wisconsin 38 ». les résultats (Pl. VIII) montrent que les bandes 1 et 3 de *Taraxacum* sont actives sur ce test de cytokinines, ainsi que les deux bandes de l'endive, l'activité étant sensiblement égale à celle de la 6-furfuryl-aminopurine employée à 0,1 mg/l (ligne « K 0,1 »).

Les mêmes expériences ont été renouvelées, mais, cette fois, les milieux S ont été ensemencés avec des fragments de tige de *N. suaveolens*. Les résultats obtenus (Pl. IX) sont résumés dans le tableau XXI. On peut voir que les bandes 1 et 3 de *Taraxacum* favorisent nettement la néoformation des bourgeons, ainsi que les bandes 1 et 2 de *Cichorium*, bien que l'effet soit moins prononcé dans ce dernier cas.

TABLEAU XXI

Action des cytokinines extraites de racines de Taraxacum *et de* Cichorium *sur le bourgeonnement de* Nicotiana suaveolens *cultivé* in vitro.

Résultats après 3 semaines de culture

Milieux (milieu S + AIA, 1 mg/l)	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :	
	total	avec bourg.	%	total	pour 10 cultures
Témoins	12	10	**83**	19	**16**
+ kinétine (1 mg/l)	12	12	**100**	300	**250**
+ *Taraxacum*					
bande 1	12	12	**100**	74	**61**
bande 2	12	5	**41**	14	**11**
bande 3	12	12	**100**	75	**62**
bande 4	12	9	**75**	17	**14**
+ *Cichorium*					
bande 1	12	12	**100**	45	**37**
bande 2	11	9	**81**	37	**33**

3) Echec des essais d'extraction des cytokinines des des trois *Nicotiana*. — Après ces résultats, nous avons essayé d'employer la même méthode pour déceler les cytokinines des trois types de *Nicotiana*. Malheureusement nos efforts ont été vains, et nous n'avons pas pu obtenir de ces plantes des extraits qui soient actifs sur le test moelle de tabac. Sur le bourgeonnement de fragments de tige de *N. suaveolens*, par contre, ces extraits (et leurs constituants séparés par chromatographie) ont très souvent inhibé le bourgeonnement (voir Section D). Nous ne pouvons donc pas dire si *N. suaveolens* contient plus ou moins de cytokinines endogènes que *N. glauca*.

l) Action de la kinétine sur le bourgeonnement des trois *Nicotiana*. — Par contre, nous avons essayé l'effet de la kinétine (6-furfurylaminopurine) sur le bourgeonnement des trois types de *Nicotiana*. Les résultats des diverses expériences sont consignés dans le tableau XXII. Ils montrent que la kinétine stimule le bourgeonnement de *N. suaveolens* et de l'hybride, mais pas celui de *N. glauca*, du moins lorsque les milieux contiennent 1 mg/l d'AIA.

TABLEAU XXII

Effet de la kinétine sur la néoformation de bourgeons par des fragments de tiges de N. suaveolens, N. glauca *et leur hybride, cultivés* in vitro.

Milieux	Nombre de bourgeons calculés pour 10 cultures		
	N. suaveolens	Hybride	*N. glauca*
Milieu S, 3 % saccharose	90	60	0 ?
id., avec AIA (1 mg/l)	32	5	0
id., avec AIA (1 mg/l) plus kinétine : 0,1 mg/l	83	—	0
id., avec AIA (1 mg/l) plus kinétine : 1 mg/l	300 environ	100 environ	0

G - EFFET DES GLUCIDES SUR LE BOURGEONNEMENT DES TROIS *NICOTIANA*

1) Introduction. — Au cours de nos expériences sur la Cardamine, nous avions montré que le glucose et, surtout, le saccharose augmentaient le nombre de bourgeons formés. Nous avons donc étudié également s'il existait des différences entre les trois

types de *Nicotiana*, d'une part dans les teneurs en sucres de leurs tissus, d'autre part dans leur réaction à diverses concentrations de saccharose ajouté aux milieux de culture.

2) Analyse des teneurs en sucres des trois *Nicotiana*. — Les résultats obtenus avec la méthode de Bertrand sont consignés dans le Tableau XXIII. On constate que, par unité de poids

TABLEAU XXIII

Concentration des sucres réducteurs et du saccharose dans les tissus de tige des trois Nicotiana.

	N. suaveolens	Hybride	*N. glauca*
1. *Sucres totaux* (exprimés en composés en C_6) : moles/gr mat. fraîche	10×10^{-5} *M*	3×10^{-5} *M*	$1{,}9 \times 10^{-5}$ *M*
2. *Réducteurs libres* :			
a) en mg/gr matériel frais	13,4	3,9	1,56
b) en mg/gr matériel sec	142	70	22
3. *Réducteurs après hydrolyse acide douce* :			
a) en mg/gr matériel frais	16,3	4,9	3,1
b) en mg/gr matériel sec	175	88	44
4. *Saccharose* :			
a) en mg/gr matériel frais	2,9	0,9	1,45
b) en mg/gr matériel sec	31	17	21

frais, les tiges de *N. suaveolens* contiennent 8 fois plus de sucres réducteurs et deux fois plus de saccharose. On retrouve le phénomène déjà observé pour l'acide chlorogénique et, à un moindre degré, pour les auxines, à savoir que *N. suaveolens* possède les valeurs les plus élevées, *N. glauca* les plus faibles, l'hybride occupant une position intermédiaire.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus pour la mesure de la pression osmotique dans les tiges des deux espèces et de l'hybride par la méthode réfractrométrique :

N. suaveolens : 6,7 atm. $< \pi_s <$ 8,9 atm.
Hybride : 4,5 atm. $< \pi_h <$ 6,7 atm.
N. glauca : 2,2 atm. $< \pi_g <$ 4,5 atm.

3) Effet de la concentration en saccharose du milieu. — L'analyse des teneurs en glucides des différents *Nicotiana* ayant montré que les tissus des tiges de *N. suaveolens* contenaient plus de sucres que ceux de *N. glauca*, nous avons étudié l'effet, sur le bourgeonnement, d'un apport exogène de glucides. Nous avons donc ensemencé des fragments de tige des trois *Nicotiana*

sur le milieu S contenant des concentrations croissantes de saccharose, et ceci en présence ou en l'absence d'AIA.

Les résultats de ces expériences (fig. 6) ont fait apparaître que :

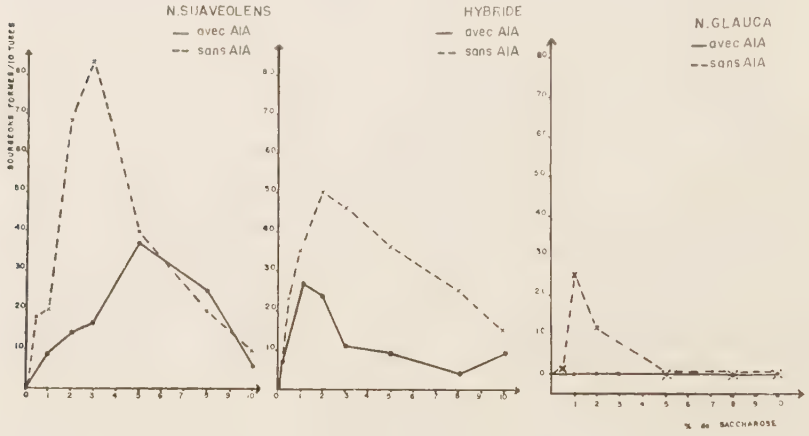


Fig. 6. — Effet de diverses concentrations de saccharose sur la néoformation de bourgeons végétatifs par des tronçons de tige de *N. suaveolens*, *N. glauca* et leur hybride cultivé *in vitro*. Milieu S additionné de 1 mg/l d'AIA (trait plein) ou sans AIA (trait pointillé).
En abcisses : concentrations en saccharose. *En ordonnées* : nombre de bourgeons formés pour 10 cultures.

1) le nombre de bourgeons formés variait fortement avec la teneur en saccharose ;

2) la concentration produisant le maximum de bourgeons variait selon que le milieu contenait ou non de l'AIA ;

3) la concentration produisant le maximum de bourgeons n'était pas le même pour les trois *Nicotiana*. Ainsi, en présence de 1 mg/l d'AIA, elle était de 5% pour *N. suaveolens*, de 1% seulement pour l'hybride.

Bien plus, ces expériences nous ont mené, comme nous le décrirons à la section H, à obtenir la néoformation de bourgeons sur *N. glauca*.

4) Mode d'action des sucres : effet de la pression osmotique. — Nous avons vu plus haut que la pression osmotique est plus élevée dans le cas de *N. suaveolens* que dans celui de *N. glauca*. On pourrait donc penser que l'optimum de la concentration en sucre pour chacun des trois *Nicotiana* est une fonction de la pression osmotique que ces glucides déterminent dans le milieu.

Pour éprouver le bien fondé de cette hypothèse, nous avons inclus dans une série de milieux :

a) du mannitol à diverses concentrations,

b) du saccharose aux concentrations de 10^{-2} *M* (= 0,68%), 3×10^{-2} *M* (=2,02%), 10^{-1} *M* (=6,81%) et 2×10^{-1} *M* (=13,68%) ;

c) des mélanges de saccharose et de mannitol en proportions diverses, mais produisant une concentration finale en hydrates de carbone de 10^{-2} *M*, 3×10^{-2} *M*, 10^{-1} *M* et 2×10^{-1} *M*.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau XXIV. On voit, tout d'abord, que dans tous les cas où les cultures ne contiennent que du mannitol sans saccharose, aucun bourgeon n'a été formé. Dans ces séries-là, d'ailleurs, aucune croissance ne s'est produite. On peut donc dire que le mannitol est incapable de remplacer le rôle trophique du saccharose dans le cas de *N. glauca*. Il est donc possible d'employer ce corps comme agent osmotique non trophique.

Le saccharose seul, par contre, a permis le bourgeonnement. C'est la concentration la plus faible employée (10^{-2} *M* = 0,68%) qui a donné le taux de bourgeonnement le plus élevé : toutes les cultures ont produit des bourgeons, à raison d'une moyenne de 3 bourgeons par culture. Cette intensité de bourgeonnement a été réduite progressivement par des concentrations croissantes de saccharose.

Lorsque nous avons remplacé partiellement le saccharose par du mannitol, de façon à obtenir les mêmes concentrations osmotiques que celles que nous avions réalisées avec du saccharose pur, nous avons obtenu des résultats qui militent en général pour un rôle trophique du saccharose. En effet, si nous incorporons aux milieux de culture une concentration en saccharose de $3\times10^{-2}M$, 75% des cultures forment des bourgeons avec un total de 22 bourgeons pour 10 cultures. Si nous y ajoutons 7×10^{-2} *M* de mannitol, de façon à augmenter la concentration des hydrates de carbone à 10^{-1} *M*, 66% des cultures forment des bourgeons et le total est encore de 20 bourgeons pour 10 cultures. Or si nous ajoutons ces 7×10^{-2} *M* en saccharose au lieu de mannitol, le taux de bourgeonnement n'est plus que de 37%, avec 5 bourgeons pour 10 cultures. En d'autres termes, le bourgeonnement n'est pas réduit proportionnellement à la pression osmotique, mais en proportion de la quantité de *saccharose*. Dans les autres séries, celles qui correspondent à 10^{-2} *M* ou 10^{-1} *M* de saccharose, on retrouve en gros les mêmes effets ; mais on observe aussi que la pression osmotique joue un rôle secondaire, puisque le bourgeonnement est réduit de 30% environ par adjonction de mannitol.

Il est donc possible de conclure que l'effet produit par la concentration en saccharose sur le bourgeonnement de *N. glauca* est principalement de caractère non osmotique.

TABLEAU XXIV

Séparation des effets trophique et osmotique du saccharose sur le bourgeonnement de Nicotiana glauca.
Cultures sur milieu S sans auxine. Résultats obtenus après 5 semaines.

Concentrations molaires totales	Concentrations molaires réalisées avec : saccharose	Concentrations molaires réalisées avec : mannitol	Bourgeonnement (1) obtenu avec les concentrations en saccharose : 0	10^{-2} *M* (= 0,68 %)	3×10^{-2} *M* (= 2,02 %)	10^{-1} *M* (= 6,84 %)	2×10^{-1} *M* (= 13,68 %)
10^{-2} *M* 10^{-2} *M*	10^{-2} *M* —	— 10^{-2} *M*	— 0 %, 0	100 %, 30 —	— —	— -	- —
3×10^{-2} *M* 3×10^{-2} *M*	3×10^{-2} *M* 10^{-2} *M*	— 2×10^{-2} *M*	— —	— 75 %, 21	75 %, 22 —	— -	- -
10^{-1} *M* 10^{-1} *M* 10^{-1} *M*	10^{-1} *M* 3×10^{-2} *M* —	— 7×10^{-2} *M* 10^{-1} *M*	— — 0 %, 0	— — —	— 66 %, 20 —	37 %, 5 - —	- — -
2×10^{-1} *M* 2×10^{-1} *M*	2×10^{-1} *M* 10^{-1} *M*	— 10^{-1} *M*	— —	— —	— —	— 0 %, 0	0 %, 0 —

(1) Le premier chiffre indique le pourcentage des cultures ayant produit des bourgeons, le second chiffre le nombre de bourgeons formés pour 10 cultures.

H. — STIMULATION DU BOURGEONNEMENT *IN VITRO* DE FRAGMENTS DE TIGES DE *N. GLAUCA*

Au cours de notre travail, nous avons cherché à analyser certaines différences dans la constitution chimique des explantats qui pourraient être en rapport avec leur plus ou moins grande facilité à produire des bourgeons. Les résultats de ces analyses ont montré que *N. suaveolens*, qui bourgeonne abondamment, contenait plus d'auxine et plus de sucres que *N. glauca* qui ne bourgeonne pas.

D'autre part, l'addition de divers produits aux milieux de culture a montré que :

a) le milieu S, qui contient d'ailleurs des produits favorisant le bourgeonnement tels que le glycocolle (Paulet et Nitsch, 1959) et l'inositol (Jacquiot, 1951), encourageait le bourgeonnement plus que le milieu K,

b) l'auxine inhibait toujours le bourgeonnement,

c) la kinétine stimulait le bourgeonnement,

d) une concentration en saccharose trop faible ou trop élevée défavorisait le bourgeonnement.

Fort de ces résultats, nous avons repris nos efforts pour faire bourgeonner des fragments de tige de *N. glauca*. Nous avons donc employé le milieu S, sans AIA, et avec une concentration en saccharose abaissée à 1%. Les résultats ont été positifs : les fragments ont produit des bourgeons (Pl. X, fig. 1). L'addition d'AIA (1 mg/l) a, comme on pouvait s'y attendre, supprimé tout bourgeonnement. Nous avons donc tenté d'intensifier encore la production de bourgeons en ajoutant de la kinétine, mais, comme le montrent les résultats ci-dessous, la kinétine n'a pas augmenté le nombre de bourgeons formés.

Milieux :	Bourgeons obtenus sur 10 cultures de *N. glauca*
Milieu S, 1% de saccharose	26
id. + kinétine 0,1 mg/l	24
id. + kinétine 1 mg/l	28
id. + AIA (1 mg/l)	0

Nous avons répété la même expérience en employant le milieu K et avons obtenu des bourgeons en l'absence d'auxine et avec 1% de saccharose. Cependant, le nombre des bourgeons formés et leur croissance étaient beaucoup moins forts qu'avec le milieu S.

I. — DISCUSSION

Essayons de regrouper, pour les analyser, les divers résultats expérimentaux obtenus avec *N. suaveolens*, *N. glauca* et leur hybride. Le premier, rappelons-le, bourgeonne spontanément, le second ne bourgeonne pas et l'hybride a des propriétés intermédiaires entre les deux parents.

Nous étudierons d'abord l'action des différents composés introduits dans les milieux de culture et ensuite de ceux présents à l'intérieur des organes mis en culture. Enfin, nous essayerons de dégager quelques conclusions des différences observées.

1) Étude des composés introduits dans les milieux de culture :

Nous étudierons successivement :

a) quelques facteurs responsables du niveau des auxines,

b) quelques facteurs agissant probablement au niveau des acides nucléiques,

c) l'action du saccharose.

a) *Les facteurs responsables du niveau des auxines* :

— *Effet, sur le bourgeonnement, d'un apport d'auxine au milieu de culture.* — Les résultats de l'expérience de départ (Pl. I et II) ont montré que la présence d'AIA à la concentration de 1 mg/l inhibait tout bourgeonnement chez *Nicotiana glauca* et pratiquement aussi chez l'hybride. Ce point a été vérifié ultérieurement lorsqu'il s'est révélé possible de stimuler le bourgeonnement de *N. glauca* par une concentration appropriée de saccharose : l'AIA a toujours inhibé complètement ce bourgeonnement (voir fig. 6).

Chez les tissus qui bourgeonnent difficilement, la néoformation de bourgeons est donc fortement inhibée par l'auxine. Chez les tissus, tels que ceux de *N. suaveolens*, qui bourgeonnent aisément, l'auxine inhibe bien le bourgeonnement comme le montrent la fig. 4 et l'étude statistique du début (fig. 1 et tableaux I et II), mais ces tissus gardent la possibilité de surmonter, en partie tout au moins, l'effet inhibiteur de l'auxine. Nous avons vu que, dans le cas de *N. suaveolens*, le poids (frais et sec) de bourgeons formés demeure inchangé, que l'on ajoute ou non de l'AIA au milieu (tableaux V et VI). Ce résultat s'inscrit dans le cadre des connaissances acquises depuis une vingtaine d'années, à savoir que, si l'auxine inhibe la néoformation des bourgeons, elle stimule, par contre, la croissance des bourgeons (Gautheret, 1942).

On peut penser que, si certains tissus, tels que ceux du *N. glauca*, n'ont jamais donné de bourgeons *in vitro*, c'est précisément parce que, pour les faire proliférer, on a toujours ajouté de l'auxine aux milieux sur lesquels on les cultivait.

— *Effet des composés phénoliques introduits dans le milieu de culture.* — Nous avons vu que des composés phénoliques tels que la rutine et l'acide chlorogénique inhibent le bourgeonnement *in vitro* des fragments de tiges de *N. suaveolens* à des concentrations relativement faibles (5×10^{-6} *M*, 5×10^{-5} *M*). Ces composés stimulent au contraire la rhizogénèse (Pl. V).

Il est connu que l'acide chlorogénique, la rutine et d'autres composés phénoliques naturels ont un effet de synergie avec l'AIA (Nitsch et Nitsch, 1959, 1961) parce qu'ils économisent l'AIA (Henderson et Nitsch, 1962) en bloquant sa destruction par l'AIA-oxydase (Rabin et Klein, 1957 ; Tomazewski, 1963 ; Pilet, 1964).

La discussion de l'action de ces composés a fait l'objet d'une récente communication (Paulet et Lioret, 1965).

Si l'on reprend les travaux de Rabin et Klein, on voit que ces auteurs obtiennent, après la transformation des données par les inverses (selon Lineweaver et Burk), un faisceau de droites coupant l'axe des ordonnées en un seul point, ce qui est la preuve du caractère compétitif de l'inhibition. Cependant les paramètres de l'enzyme n'ont pas été déterminés, en particulier l'affinité pour le substrat et l'affinité pour l'inhibiteur. Les données de Rabin et Klein permettent de calculer les constantes suivantes :

Km (constante de dissociation du complexe AIA-enzyme) = $2{,}7\times10^{-5}$ *M* ;

Ki (constante de dissociation ac. chlorogénique - enzyme) = 2×10^{-7} *M*.

On voit que l'acide chlorogénique a une affinité pour l'enzyme plus de 100 fois supérieure à celle de l'acide indolyl-acétique ; c'est-à-dire qu'il suffit de très petite quantité du composé phénolique pour protéger l'acide indolyl-acétique de toute oxydation.

Dans le cas présent, il est aisé de supposer que l'acide chlorogénique introduit dans le milieu, même en concentration faible, se combine avec l'acide indolyl-acétique-oxydase après avoir pénétré dans le cytoplasme. De ce fait, l'acide indolyl-acétique ne serait plus oxydé et la quantité présente dans le cytoplasme atteindrait une valeur suffisante pour inhiber le bourgeonnement.

b) *Etude de quelques facteurs agissant probablement au niveau des acides nucléiques* :

N'ayant pas réussi à doser les cytokinines dans les tissus, nous avons porté nos efforts sur les modifications que peuvent apporter certaines substances au bourgeonnement de fragments de tiges cultivés *in vitro*. Il s'agit de bases entrant dans la composition des acides nucléiques, de leurs précurseurs, d'analogues divers et de cytokinines naturelles ou synthétiques.

— *Effet d'un apport de bases puriques et pyrimidiques.* — Les résultats obtenus par la culture *in vitro* de fragments de tiges de *N. suaveolens* et consignés dans les tableaux VII, VIII et IX, ont mis en lumière l'effet stimulateur des bases puriques et pyrimidiques sur le bourgeonnement. On peut cependant difficilement établir à quel niveau agissent ces bases, même par l'emploi de leurs analogues. L'action stimulatrice plus forte de la thymine laisse penser que l'ADN serait plus directement mis en cause, ce qui est compatible avec la multiplication cellulaire intense qui précède la formation des bourgeons. Mais ces phénomènes d'organogénèse s'accompagnent aussi d'une synthèse importante des protéines où l'ARN intervient.

Les connaissances actuelles dans ce domaine ne permettent pas encore de tirer de conclusions nettes de nos résultats. Cependant, si l'on considère la moyenne des bourgeons formés par les explantats soumis à l'influence de ces composés, on voit qu'elle se situe au voisinage de huit et qu'aucun explantat n'a porté plus de 17 bourgeons, chiffre que nous obtenons sur le milieu témoin dépourvu d'AIA. Il semble donc que les bases puriques et pyrimidiques n'agissent pas en augmentant la potentialité de bourgeonner du tissu, comme le fait la kinétine (moyenne de 30 bourgeons par explantat), mais en permettant à la potentialité déjà existante de se développer pleinement en la libérant de l'inhibition provoquée par l'AIA exogène. Il n'est donc pas étonnant que ces composés soient sans action sur le bourgeonnement des cultures de *N. glauca* qui est très fortement inhibé par le moindre apport d'auxine.

— *Effet d'un apport de kinétine.* — L'apport de kinétine aux milieux de culture a augmenté de façon spectaculaire le nombre des bourgeons formés, aussi bien chez *N. suaveolens* que chez l'hybride. Chez *N. glauca*, par contre, la kinétine n'a pas pu causer la formation de bourgeons en présence de 1 mg/l d'AIA, ni l'accroître en présence de 1% de saccharose sur le milieu sans AIA. Il semble que, lorsque la kinétine agit, elle augmente considérablement la potentialité de bourgeonnement du tissu (souvent plus de 30 bourgeons par explantat), ce qui n'est pas le cas des bases puriques et pyrimidiques.

Mais la kinétine semble être impuissante à augmenter le bourgeonnement de *N. glauca*. On peut penser que cette espèce ne serait sensible qu'à une cytokinine spécifique, mais nous avons échoué dans nos tentatives de la mettre en évidence.

— *Effet d'un apport de cytokinines naturelles.* — Deux fractions contenant des cytokinines naturelles, purifiées par adsorption sur charbon actif et chromatographie, ont également stimulé le bourgeonnement de *N. suaveolens*. Ces fractions provenaient

de racines de *Taraxacum* et de *Cichorium*. Elles n'ont pas été essayées sur des cultures de *Nicotiana glauca*, ni de l'hybride.

— *Conclusions.* — Les résultats obtenus avec les bases puriques et pyrimidiques, la kinétine et les cytokinines naturelles sont malheureusement encore fragmentaires, en ce sens que ces dernières substances n'ont pas été essayées sur *N. glauca* et l'hybride. Cependant, sur *N. suaveolens*, toutes ces substances ont nettement stimulé le bourgeonnement. La kinétine qui s'est montré le plus actif de tous les composés essayés, a également provoqué l'apparition de bourgeons sur les cultures de l'hybride ; par contre, elle n'a pu provoquer le bourgeonnement sur les cultures de *N. glauca*.

Nous pouvons conclure que les substances qui entrent dans la synthèse des acides nucléiques favorisent la formation des bourgeons. Cependant le mode d'action des bases puriques et pyrimidiques, ainsi que nous l'avons dit plus haut, semble être distinct de celui de la kinétine.

c) *L'action du saccharose* :

Chez les cultures de *N. suaveolens*, la production maximum de bourgeons est atteinte (en présence de 1 mg/l d'AIA) lorsque la concentration en saccharose du milieu atteint environ 5%. Aucun bourgeon ne se forme en l'absence de saccharose ou lorsque la concentration en ce produit n'est que de 0,1%. Les courbes de la fig. 6 indiquent que, d'une part, la néoformation des bourgeons est fortement influencée par la concentration en saccharose du milieu et que, d'autre part, l'optimum de la concentration en sucre se déplace si l'on supprime l'auxine.

Dans le cas de l'hybride, la concentration en sacharose produisant le maximum de bourgeons (en présence de 1 mg/l d'AIA) est bien différente : 1% seulement (voir fig. 6). Ici encore, la suppression d'auxine permet une production de bourgeons plus importante et déplace l'optimum de la concentration en saccharose.

Dans le cas de *N. glauca* enfin, on n'obtient aucun bourgeon en présence d'AIA. En l'absence d'AIA, par contre, des bourgeons se forment, à condition que la concentration en saccharose reste faible (1%).

Les résultats obtenus avec le saccharose sont d'autant plus intéressants qu'ils ont permis, pour la première fois semble-t-il, de faire bourgeonner *in vitro* des cultures de *N. glauca*. Ils indiquent aussi l'existence d'un équilibre auxine-sucres dans les phénomènes de bourgeonnement. On peut l'exprimer ainsi : plus le tissu considéré est riche en auxine, plus il faut de sucre pour provoquer le bourgeonnement. Ainsi, dans le cas de *N. glauca*, pauvre en auxine et cultivé sur un milieu sans auxine, une concentration de 5% de saccharose inhibe totalement le bourgeonnement, alors qu'elle le stimule chez *N. suaveolens* cultivé sur un milieu riche en auxine.

Nous avons vu aussi que, pour agir, les sucres devaient être métabolisés. On peut donc dire que leurs effets sont de nature trophique plutôt qu'osmotique.

Rappelons que l'AIA produit une augmentation de la teneur en sucres réducteurs à l'intérieur des tissus de tige de tabac « Wisconsin 38 » (Skoog et Robinson, 1950 ; Robinson, 1951) et de ceux de racines de carottes (Goris, 1950 et 1954 ; Wiggans, 1954 ; Goris et Duhamet, 1958) cultivés en présence de saccharose. L'adénine et le lait de coco produisent l'effet inverse (Wiggans, 1954).

En dépit des différences importantes de concentration qui existent entre les niveaux où agissent sucres et auxines, on ne peut exclure la possibilité de la formation d'un ester glucose-AIA dont Zenk (1961) a montré l'existence dans les plantes. L'administration d'AIA à divers tissus cause la formation immédiate d'AIA-glucose (Zenk, 1963). A l'heure actuelle on peut penser qu'il s'agirait là d'un phénomène de désintoxication. Il n'est pas impossible qu'une telle désintoxication puisse jouer un rôle dans les phénomènes de bourgeonnement.

2) Étude des composés présents a l'intérieur des organes mis en culture :

a) *Teneur des tissus en auxines naturelles.* — Le tableau XXV résume les différents résultats des dosages d'acide chlorogénique, de glucides et de facteurs de croissance B et C dans les trois types de *Nicotiana*. Le dosage biologique des substances de croissance montre que c'est *N. suaveolens* qui contient la plus forte concentration d'auxine « C ». Or c'est également l'espèce dont le bourgeonnement est le moins sensible à l'addition d'AIA dans les milieux de culture. Il resterait à déterminer le rôle des substances de la zone « B » des chromatogrammes, qui sont présentes en quantité plus importante chez *N. suaveolens* que chez les autres *Nicotiana* étudiés. Les résultats de l'expérience préliminaire mentionnée p. 53 montrent que les substances de la zone « B » ont été incapables de provoquer le bourgeonnement chez *N. glauca*.

La teneur des tiges de *N. suaveolens* en auxine « C » est de 0,13 mg/l, ce qui est du même ordre de grandeur que les quantités d'AIA introduites généralement dans les milieux (de 0,1 à 1 mg/l).

b) *Teneur des tissus en acide chlorogénique.* — Les dosages d'acide chlorogénique ont montré (voir tableau XVI) que les tiges de *N. suaveolens* en contenaient le plus, celles de *N. glauca*, le moins, l'hybride ayant une teneur intermédiaire entre celles des deux parents.

Si l'on veut admettre que les composés phénoliques agissent

TABLEAU XXV

Comparaison de quelques caractéristiques des tissus de tige chez les trois Nicotiana *étudiés.*

	N. suaveolens	Hybride	*N. glauca*
Aptitude au bourgeonnement :	+++	+	0
Pourcentage de matière sèche (dans 100 g de tissu frais)	9,3 %	5,1 %	7,1 %
Teneur en acide chlorogénique (mg) :			
a) par gr de matériel frais	0,56 mg	0,18 mg	0,17 mg
b) par gr de matériel sec	6,0 mg	3,2 mg	2,4 mg
Sucres réducteurs avant hydrolyse (mg) :			
a) par gr de matériel frais	13,3 mg	3,93 mg	1,56 mg
b) par gr de matériel sec	142 mg	70 mg	22 mg
Saccharose :			
a) par gr de matériel frais	2,7 mg	0,97 mg	1,54 mg
b) par gr de matériel sec	33 mg	18 mg	22 mg
Substances de croissance de la zone B (exprimées en µg d'AIA) :			
a) par kg de matériel frais	80 µg	23 µg	19 µg
b) par kg de matériel sec	866 µg	446 µg	271 µg
Substances de croissance de la zone C (exprimées en µg d'AIA) :			
a) par kg de matériel frais	131 µg	61 µg	31 µg
b) par kg de matériel sec	1420 µg	1214 µg	441 µg

en protégeant l'acide indolyl-acétique de son oxydation par l'AIA-oxydase, comme c'est le cas pour l'acide chlorogénique introduit dans le milieu, il faut admettre que les tissus sont insensibles aux composés phénoliques internes. En effet, la concentration de ces composés dans les tissus est telle qu'ils peuvent inhiber les quantités d'enzyme au moins 1000 fois supérieures à celles susceptibles d'être trouvées. Ces composés seraient donc localisés dans une portion de cellule autre que celle renfermant l'enzyme, phénols et enzyme ne pouvant alors se combiner. On pourrait admettre, comme l'a supposé Tomazewski (1963), que les phénols sont localisés dans la vacuole dont le tonoplasme les isolent plus ou moins du cytoplasme, empêchant ainsi leur action physiologique. Cependant le fait que les tissus qui bourgeonnent le plus (ceux de *N. sua-*

veolens) contiennent plus de composés phénoliques que ceux qui bourgeonnent le moins (ceux de *N. glauca*) semble montrer qu'il existe une relation entre les composés phénoliques internes, l'auxine (dont les différences de teneur vont dans le même sens) et le bourgeonnement. Il serait utile d'étudier par la suite la perméabilité du tonoplasme à ces produits chez les deux espèces.

c) *Teneur des tissus en sucres solubles.* — Les dosages des sucres réducteurs et du saccharose ont montré que *N. suaveolens* contenait, par unité de poids frais, 8 fois plus de sucres réducteurs que *N. glauca* et deux fois plus de saccharose. La teneur en sucres réducteurs de l'hybride est intermédiaire entre celle des parents, celle en saccharose étant légèrement plus faible que celle de *N. glauca*.

Fait curieux à signaler, si l'on exprime les résultats en concentration de sucres en C_6, on obtient les valeurs suivantes pour la teneur en sucres totaux et celle du milieu qui a produit l'optimum de bourgeonnement :

	Tiges	Milieux de culture
N. suaveolens	0,1 *M*	0,3 *M*
Hybride	0,03 *M*	0,1 *M*
N. glauca	0,02 *M*	0,06 *M*

On constate que l'optimum de concentration en sucres des milieux de culture a toujours une valeur 3 fois supérieure à celle de la teneur en sucres totaux des fragments mis en culture.

3) Conclusions :

Les expériences comparatives effectuées sur les trois *Nicotiana* ont montré que :

a) *Nicotiana suaveolens*, qui bourgeonne facilement, a une teneur plus élevée en auxine, acide chlorogénique et glucides que *N. glauca* qui bourgeonne difficilement, l'hybride ayant sur tous ces points des propriétés intermédiaires. Il faut distinguer l'acide chlorogénique introduit dans le milieu de culture de l'acide chlorogénique endogène, ce dernier ne semblant pas avoir d'action physiologique marquée.

b) L'équilibre auxine-cytokinine proposé par Skoog et Miller comme régissant la néoformation des bourgeons est confirmé, à condition toutefois d'admettre que les tissus de tige de *N. glauca* contiennent une cytokinine spécifique autre que la kinétine, car ils ne sont pas sensibles à cette dernière.

c) Il semble aussi exister un équilibre auxine-sucres dont la mise à profit a permis de faire bourgeonner les tissus de tige de *N. glauca* qui, jusqu'ici, ne bourgeonnaient pas en culture *in vitro*.

d) L'analyse préalable du contenu tissulaire peut apporter des renseignements précieux pour la compréhension du comportement physiologique des organes *in vitro*.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LA NÉOFORMATION DES BOUTONS FLORAUX

A. — OBSERVATION D'UN PHÉNOMÈNE NOUVEAU : LA NÉOFORMATION DE BOUTONS FLORAUX SUR CULTURES DE RACINES DE *CICHORIUM INTYBUS* L.

Lors d'une expérience concernant l'action de certains composés phénoliques sur la néoformation de bourgeons chez l'endive (*Cichorium intybus* L.), nous avons observé la formation de boutons floraux sur les fragments de racines mis en culture. Ces bourgeons s'épanouirent en fleurs parfaitement normales et pigmentées en bleu comme chez les plantes entières (Pl. X, fig. 2). Nous nous sommes attachés alors à rechercher les conditions physiologiques présidant à la formation de fleurs sur ces cultures de tissus (Paulet et Nitsch, 1964 *a* et *b*).

Jusqu'alors, en effet, la néoformation de fleurs n'avait été signalée que sur des fragments de hampes florales d'une seule variété de *Nicotiana tabacum* : « Wisconsin 38 » (Chouard et Aghion, 1961 ; Aghion, 1962). Ce résultat n'avait pu être étendu à tous les *Nicotiana*, ni à des plantes appartenant à d'autres genres ou à d'autres familles. Cependant, signalons qu'au cours de nos expériences avec le *N. suaveolens*, nous avons obtenu sporadiquement la formation de boutons floraux (voir Section J). Mme Aghion-Prat (communication personnelle) a également obtenu des boutons floraux sur des cultures de cette espèce. Enfin, récemment, Mme Motamed a observé la formation de quelques petits boutons floraux sur des cultures de *Datura metel*, mais ces boutons ne se sont pas développés en fleurs (Motamed, 1964).

Les boutons floraux n'avaient été obtenus, dans le cas du tabac, qu'avec des fragments d'*inflorescence*. Dans le cas de l'endive, les fleurs apparaissent sur des cultures de tissus de *racines*, ce qui en augmente l'intérêt. Enfin les efforts déployés pour provoquer la néoformation des bourgeons floraux sur des variétés photopériodiques de *Nicotiana* ayant échoués (Aghion, 1962), il était intéressant de poursuivre l'étude d'un matériel comme l'endive qui présente pour la mise à fleurs, des exigences à la fois de vernalisation et de photopériodisme (Hartman, 1956). Pour toutes ces raisons il était important d'étudier plus à fond les modalités de l'induction de boutons floraux sur les cultures d'endive.

B. — INFLUENCE DE L'ORIGINE DES TISSUS SUR LA NÉOFORMATION DES FLEURS

Il nous fallait préciser tout d'abord l'importance, pour la formation de ces boutons, de l'origine des tissus. Au début de notre travail nous avons prélevé des échantillons calibrés d'une part dans la région cambiale, d'autre part dans la région du xylème central. Les milieux contenaient 5% de saccharose et de l'acide *para*-coumarique à la concentration de 10^{-5} *M*. Dans tous les cas nous avons observé la néoformation de bourgeons floraux, c'est-à-dire aussi bien sur les cultures dérivées du parenchyme

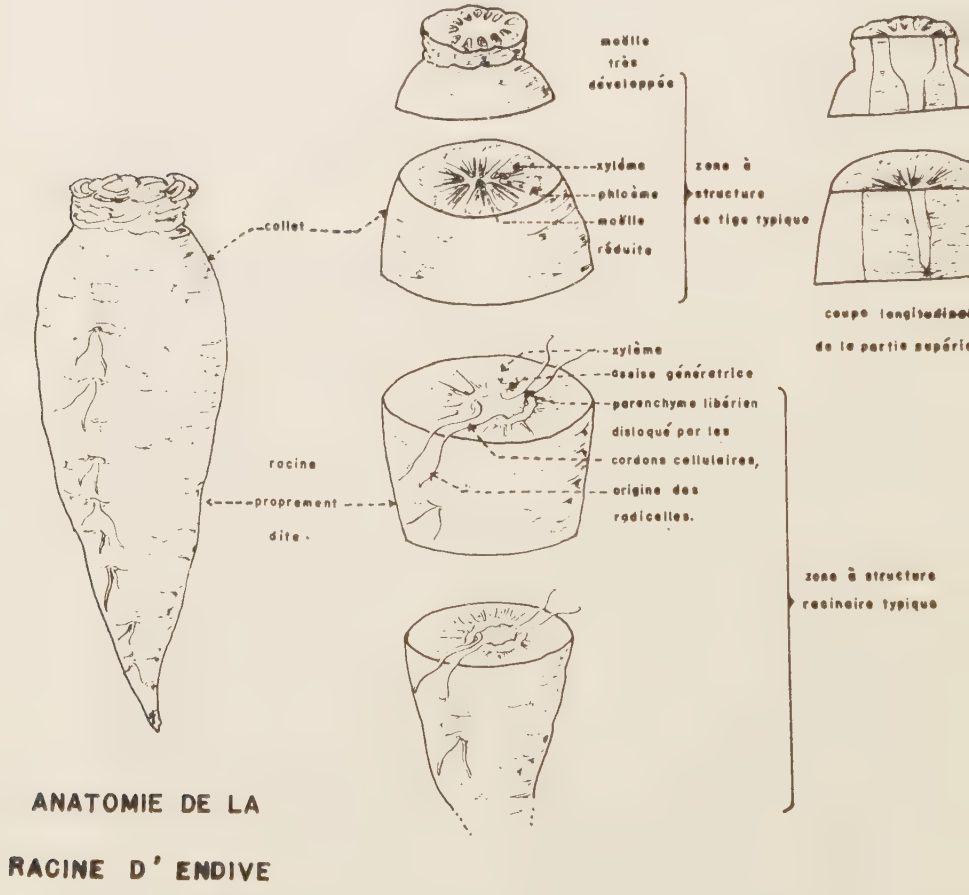


Fig. 7. — Représentation schématique des diverses régions morphologiques de la racine d'endive.

vasculaire que sur celles provenant de la région du cambium et du liber.

Une observation plus attentive de l'anatomie de l'endive « Witloof » a fait apparaître que la partie supérieure de la partie enterrée avait, en réalité, une structure de tige (voir schéma, fig. 7). Des explantats prélevés dans cette partie ont donné des fleurs. Il en a été de même pour deux prélevés dans la partie inférieure à structure racinaire typique.

On peut conclure que la potentialité de donner des boutons floraux existe dans toutes les parties de la racine, on peut même dire dans toute la plante, car Nitsch et Nitsch (1964) ont obtenu des boutons floraux à partir de cultures de fragments de feuilles et Margara (1965) a, tout récemment, observé la formation de fleurs à partir de hampes florales.

C. — ROLE DU MILIEU DE BASE

Le milieu K produit une croissance moins rapide que le milieu S. Ainsi, sur le premier milieu, les boutons floraux mettent-ils plus d'un mois à apparaître, tandis qu'ils sont déjà visibles après trois semaines de culture sur le second milieu et sont plus nombreux. Cependant le milieu S étant plus favorable à la formation des bourgeons végétatifs, ainsi que nous l'avons déjà fait observer lors de notre étude sur le bourgeonnement, il arrive que ceux-ci, trop nombreux, étouffent les boutons floraux qui avortent. De fait c'est le milieu K qui nous a toujours permis de déterminer le mieux l'action des divers composés phénoliques.

D. — ACTION DE L'ACIDE INDOLYL-3-ACÉTIQUE

L'addition au milieu de culture d'une auxine, telle que l'acide indolyl-3-acétique, inhibe totalement la formation des bourgeons floraux, même lorsqu'elle permet le développement de bourgeons végétatifs (tableau XXVI).

Des explantats ensemencés sur milieu K contenant 1 mg/l d'AIA, laissés dix jours sur ce milieu, puis repiqués sur un autre milieu sans auxine, n'ont jamais pu donner de bourgeons floraux. Un traitement préalable de 10 jours à l'auxine suffit donc à éliminer la néoformation de fleurs (tableau XXVI).

Des expériences faites avec différentes concentrations d'acide indolyl-3-butyrique ont donné des résultats identiques. Cette auxine inhibe donc aussi la néoformation des fleurs, contrairement à ce que trouve Lona (1963) sur la plante entière d'*Hydrophyllum virginicum*.

Une anti-auxine, l'acide 2,3,5-triiodobenzoïque (TIBA), ajoutée aux milieux avec ou sans auxine n'a eu aucun effet sur la néoformation des fleurs.

TABLEAU XXVI

Influence de l'acide indolyl-3-acétique sur la néoformation de boutons floraux chez Cichorium intybus *L. « Witloof ».*

Milieux	Nombre de cultures : total	avec fleurs	%	Nombre total de bourgeons : végétatifs	floraux	%
1) *Effet de l'AIA incorporé au milieu* :						
A. Milieux sans AIA :						
a) Milieu K, 3 % saccharose	5	1	**20**	5	1	**20**
b) id. + acide chlorogénique (5×10^{-5} *M*)	6	3	**50**	7	3	**42**
c) id. + acide *p*-coumarique (5×10^{-5} *M*)	7	5	**71**	7	5	**71**
B. Milieux avec AIA (1 mg/l) :						
a) Milieu K, 3 % saccharose	9	0	**0**	4	0	**0**
b) id. + acide chlorogénique (5×10^{-5} *M*)	9	0	**0**	1	0	**0**
c) id. + acide *p*-coumarique (5×10^{-5} *M*)	8	0	**0**	0	0	**0**
2) *Effet d'un prétraitement à l'AIA* :						
A. Milieux sans AIA :						
a) Milieu K, 5 % saccharose	12	2	**17**	33	3	**9**
b) id. + acide *p*-coumarique (10^{-5} *M*)	11	4	**36**	26	7	**27**
c) id. + acide *p*-coumarique (10^{-4} *M*)	12	1	**8**	33	1	**3**
B. Dix jours sur milieu avec AIA (1 mg/l), puis repiquage sur milieux sans AIA :						
a) Milieu K, 5 % saccharose	12	0	**0**	16	0	**0**
b) id. + acide *p*-coumarique (10^{-5} *M*)	12	0	**0**	21	0	**0**
c) id. + acide *p*-coumarique (10^{-4} *M*)	12	0	**0**	17	0	**0**

E. — ROLE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET PRODUITS VOISINS

C'est par l'étude de l'action des composés phénoliques sur le bourgeonnement végétatif que nous avons mis en évidence leur rôle sur la néoformation des fleurs. Ainsi que nous l'avons dit plus haut, ces composés inhibent la destruction de l'AIA par l'auxine-oxydase. Mais la présence, dans les fleurs, de pigments anthocyaniques ou flavoniques dont les précurseurs sont précisément les acides cinnamiques laisse penser que ces produits pourraient plutôt avoir un rôle métabolique dans les phénomènes de floraison.

Les premiers composés phénoliques que nous avons essayés ont été l'acide chlorogénique et l'acide *p*-coumarique. Ces deux produits, employés sans auxine et à des concentrations faibles, ont stimulé la formation des boutons floraux, surtout l'acide *p*-coumarique (tableaux XXVII et XXVIII). A des concentrations plus fortes ils ont inhibé la formation des fleurs.

En présence d'AIA, même à faible concentration, ils ont renforcé l'action inhibitrice de cette auxine sur le bourgeonnement, de sorte que la néoformation des bourgeons végétatifs eux-mêmes a été réprimée, confirmation, sur l'endive, des résultats obtenus avec les *Nicotiana*.

Parmi les composés qui ont été essayés, seuls l'acide chlorogénique, l'acide *para*-coumarique, et, peut-être, la coumarine (à la concentration de 10^{-6} *M*) ont stimulé la néoformation des fleurs. Il est à remarquer que ni l'acide caféique, constituant de l'acide chlorogénique, ni l'acide férulique qui est chimiquement très voisin de l'acide caféique, n'ont stimulé la floraison (tableau XXVII)

Parmi les acides coumariques, seul l'isomère *para* a stimulé la floraison (tableau XXVIII).

Parmi les précurseurs des composés phénoliques, l'acide shikimique n'a pas eu d'effet. Par contre, la phénylalanine seule ou additionnée d'acide quinique a nettement stimulé la production de boutons floraux (tableau XXIX). Les deux flavonoïdes essayés n'ont pas eu d'effet heureux : la quercétine a été sans action et le kaempférol s'est révélé toxique (tableau XXVII).

F. - NÉCESSITÉ D'UN TRAITEMENT PRÉALABLE PAR LE FROID

Les expériences qui viennent d'être décrites ont été réalisées avec des racines stockées à 1 °C pendant 3 ou 4 mois dans du sable humide. Elles étaient, par conséquent, vernalisées. Les mêmes expériences, faites avec des explantats prélevés sur des racines

TABLEAU XXVII

Effet de divers acides phénoliques et flavonoïdes sur la néoformation de boutons floraux chez Cichorium intybus « *Witloof* ».

Milieux	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :		
	total	avec fleurs	%	total	avec fleurs	%
Milieu S, 3 % saccharose	8	1	**12,5**	—	2	—
id. + acide caféique 10^{-6} *M*	8	2	**25**	—	3	—
id. + acide caféique 10^{-5} *M*	9	2	**22**	—	2	—
id. + acide caféique 10^{-4} *M*	8	1	**12,5**	—	5	—
Milieu K, 5 % saccharose	10	0	**0**	30	0	**0**
id. + acide férulique 10^{-5} *M*	9	0	**0**	12	0	**0**
id. + acide férulique 10^{-4} *M*	8	0	**0**	11	0	**0**
Milieu K, 3 % saccharose	5	1	**20**	10	2	**20**
id. + acide chlorogénique 5×10^{-5} *M*	6	3	**50**	12	5	**41**
Milieu S, 3 % saccharose	8	2	**25**	—	7	—
id. + quercétine 10^{-6} *M*	7	2	**28**	—	3	—
id. + quercétine 10^{-5} *M*	8	1	**12,5**	—	1	—
id. + quercétine 10^{-4} *M*	morts	—	—	morts	—	—
id. + kaempférol 10^{-6} *M*	7	1	**14**	—	1	—
id. + kaempférol 10^{-5} *M*	morts	—	—	morts	—	—
id. + kaempférol 10^{-4} *M*	morts	—	—	morts	—	—
id. + querc. (10^{-5} *M*) + kaemp. (10^{-5} *M*)	morts	—	—	morts		—

TABLEAU XXVIII

Effet des acides coumariques et de la coumarine sur la néoformation de boutons floraux chez Cichorium intybus « *Witloof* ».

Milieux	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :		
	total	avec fleurs	%	total	avec fleurs	%
Milieu K, 5 % saccharose	12	2	**17**	33	3	**9**
id. + acide *o*-coumarique 10^{-5} *M*	12	2	**17**	43	3	**7**
id. + acide *o*-coumarique 10^{-4} *M*	11	1	**9**	25	1	**4**
id. + acide *m*-coumarique 10^{-5} M	12	2	**17**	27	3	**11**
id. + acide *m*-coumarique 10^{-4} *M*	12	0	**0**	23	0	**0**
id. + acide *p*-coumarique 10^{-5} *M*	11	4	**36**	26	7	**27**
id. + acide *p*-coumarique 10^{-4} *M*	12	1	**8**	35	1	**3**
Milieu K, 5 % saccharose	12	1	**8**	7	1	**14**
id. + acide *p*-coumarique 10^{-5} *M*	12	6	**50**	15	8	**53**
id. + acide *p*-coumarique 3×10^{-5} *M*	12	5	**42**	23	7	**30**
id. + acide *p*-coumarique 10^{-4} *M*	12	3	**25**	20	3	**15**
Milieu S, 3 % sacchraose	11	2	**18**	—	5	—
id. + coumarine 10^{-6} *M*	11	3	**27**	—	7	—
id. + coumarine 10^{-5} *M*	10	2	**20**	—	4	—
id. + coumarine 10^{-4} *M*	12	0	**0**	—	0	—

TABLEAU XXIX

Effet de divers précurseurs des composés phénoliques sur la néoformation de boutons floraux chez Cichorium intybus « *Witloof* ».

Milieux	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :		
	total	avec fleurs	%	total	avec fleurs	%
Milieu K, 5 % saccharose	10	0	**0**	30	0	**0**
id. + acide shikimique 10^{-5} *M*	10	0	**0**	4	0	**0**
id. + acide shikimique 10^{-4} *M*	9	0	**0**	4	0	**0**
Milieu S, 3 % saccharose	8	1	**12.5**		2	
id. + phénylalanine 10^{-6} *M*	9	4	**44**		9	
id. + phénylalanine 10^{-5} *M*	8	3	**37.5**	—	5	—
id. + phénylalanine 10^{-4} *M*	8	3	**37.5**		4	—
id. + acide quinique 10^{-6} *M*	10	2	**20**		4	—
id. + acide quinique 10^{-5} *M*	8	1	**12.5**	—	2	
id. + acide quinique 10^{-4} *M*	10	3	**30**		12	—
id. + phénylal. (10^{-6} *M*) + ac. quin. (10^{-6} *M*)	7	3	**42**		5	
id. + phénylal. (10^{-5} *M*) + ac. quin. (10^{-5} *M*)	8	6	**75**		16	

n'ayant subi aucun traitement par le froid, n'avaient jamais donné lieu à la formation de boutons floraux.

Cependant il convient d'émettre quelques réserves à ce sujet, car, dans le lot d'endives provenant de notre dernière récolte, quelques pieds (environ 1%) étaient capables de donner des fleurs pratiquement sans froid. Ceci est dû à un manque d'homogénéité physiologique provenant peut-être de l'introduction de quelques graines de lignées précoces dans les nouveaux lots de graines.

Quoiqu'il en soit, le traitement préalable par le froid permet dans tous les cas une floraison systématique des explantats.

G. — EFFET DE L'ACIDE GIBBÉRELLIQUE

On sait que l'acide gibbérellique est capable de remplacer l'effet du froid totalement ou partiellement chez les plantes bisannuelles et de causer leur mise à fleur en conditions tièdes (voir Lang, 1965 ; Doorenbos et Wellensiek, 1959 ; Chouard, 1960 ; etc.). De fait, il est capable de provoquer la floraison de plantes entières de *Cichorium intybus* non vernalisées (Lona, 1960 ; Michniewicz et Kamienska, 1964).

Nous avons donc essayé l'effet de cette substance sur la formation de fleurs en culture *in vitro*. Les résultats ont été très différents suivant que nous nous sommes adressés à des tissus de racines vernalisées ou non.

1) Cas des tissus vernalisés. — Chez les échantillons vernalisés, une addition d'acide gibbérellique au milieu de culture n'a pas inhibé la mise à fleurs. Par contre le bourgeonnement végétatif a été réduit (tableau XXX), mais non totalement supprimé, comme Murashige l'a observé sur le tabac (1961 et 1964). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, l'addition d'acide gibbérellique aux milieux de culture n'a pas allongé la hampe florale mais l'a raccourcie, provoquant la formation de fleurs quasiment sessiles (Pl. XI, fig. 1).

2) Cas des tissus non vernalisés. — Nous avons ensuite essayé de remplacer la vernalisation des racines d'endive par de l'acide gibbérellique ajouté aux milieux de culture (tableau XXXI).

Lorsque le milieu de base était le milieu K, nous n'avons jamais obtenu de boutons floraux avec des explantats provenant de racines non vernalisées, lorsqu'on ajoutait diverses concentrations de GA_3 (stérilisé par filtration). Le bourgeonnement végétatif n'était pas supprimé dans ces expériences.

Avec le milieu S, nous avons vu se développer des « hampes florales » qui demeuraient cependant végétatives, formant dans certains cas des « rosettes perchées » de feuilles. Sur une centaine de cultures nous n'avons obtenu que deux fleurs.

TABLEAU XXX

Effet de l'acide gibbérellique sur la néoformation de boutons floraux sur tissus de racines de Cichorium intybus « « *Witloof* » *vernalisées.* (Acide gibbérellique stérilisé par filtration).

Milieux	Nombre de cultures :			Nombre de bourgeons :		
	total	avec fleurs	%	total	floraux	%
Milieu de base K (5 % de saccharose)	10	0	**0**	19	0	**0**
id. + GA_3 10^{-7} *M*	10	1	**10**	9	1	**11**
id. + GA_3 10^{-6} *M*	12	4	**33**	12	4	**33**
id. + GA_3 10^{-5} *M*	11	0	**0**	6	0	**0**

Les travaux de Brian et Hemming (1958) et ceux de Kuse (1958) ont montré que l'acide gibbérellique n'agit qu'en présence d'auxine. Il est possible que les différences d'auxines et autres substances de croissance qu'entraîne la vernalisation (voir Harada, 1962) soient à l'origine des différences que nous avons observées dans les effets de l'AG appliqué à des explantats provenant de racines vernalisées ou non. Nous essayerons plus tard d'envisager ce problème. En tous cas, l'AIA, apporté de l'extérieur, inhibe la floraison même en présence d'acide gibbérellique.

H. — REMPLACEMENT DE L'EFFET DU FROID PAR L'APPLICATION DE KINÉTINE ET DE TOCOPHÉROL

1) Effets de la kinétine. — Michniewicz et Kamienska (1964) ont obtenu la floraison d'endives non vernalisées en les traitant avec 15 applications de kinétine. Cette substance n'est pas aussi efficace que l'acide gibbérellique (elle n'a provoqué la floraison que de 60% des pieds plantés en plein champ le 17 mai et 0% de ceux traités dix jours plus tard, contre 100% de floraison obtenus dans tous les cas avec l'AG).

Nous avons donc essayé la kinétine en culture de tissus de racines d'endive non vernalisées. Les résultats du tableau XXXI montrent que l'addition de kinétine aux milieux (en l'absence d'auxine) a provoqué, comme l'AG, la montaison de certains des bourgeons formés. Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, les hampes florales produites par l'AG sur des tissus non vernalisés ne produisent pas de fleurs complètes dans tous les cas : les fleurs avortent, ou bien l'apex forme une rosette végétative (rosette perchée). Il en est de même pour la kinétine dans une certaine mesure, mais la tendance à former des fleurs est plus grande que pour la gibbérelline.

2) Alpha-tocophérol. — Les travaux de Sironval (1954) ont montré que les jours longs augmentaient la quantité d'« insaponifiable » que l'on pouvait extraire des feuilles d'un fraisier « des quatre saisons ». La fraction insaponifiable contient, en particulier, la vitamine E. Or Bruinsma et Patil (1963) ont montré qu'un traitement à la vitamine E remplaçait l'effet vernalisant du froid sur le seigle d'hiver « Petkus » et provoquait la floraison des pieds non vernalisés. Michniewicz et Kamienska (1964) ont obtenu également un remplacement partiel de l'effet du froid par le tocophérol sur l'endive.

Nous avons donc ensemencé des fragments de racines d'endive non vernalisées sur des milieux S additionnés d'*alpha*-1-tocophérol (sous forme de l'acétate correspondant) stérilisé par filtration, aux concentrations de 10^{-7} *M*, 10^{-6} *M* et 10^{-5} *M*. Les résul-

TABLEAU XXXI

Induction de la montaison et de la floraison sur cultures de tissus non vernalisés de racines de Cichorium intybus « *Witloof* ».

Milieux	Nombre de cultures :			Nombre de hampes florales		Nombre total de fleurs (1)
	total	avec fleurs ou hampes	%	total	avec fleurs	
Milieu K, 3 % saccharose	8	0	**0**	0	0	0
id. + kinétine 0,1 mg/l	9	2	**22**	2	1	3
id. + AG 10^{-6} *M*	7	2	**28**	0	0	0
Milieu S, 3 % saccharose	10	0	**0**	0	0	0
Acide gibbérellique 10^{-6} *M*	7	1	**14**	1	0	0
Acide gibbérellique 10^{-5} *M*	10	2	**20**	4	1	2
Acide gibbérellique 10^{-4} *M*	9	1	**11**	4	1	1
Kinétine 10^{-7} *M*	10	2	**20**	2	1	1
Kinétine 10^{-6} *M*	11	3	**27**	3	2	9
Kinétine 10^{-5} *M*	9	1	**11**	3	1	1
Ac. gibbérellique 10^{-6} *M* + Kin. 10^{-7} *M*	7	1	**14**	2	2	4

(1) Dans certains cas, nous avons obtenu plusieurs fleurs par hampe florale.

tats ont été négatifs : dans tous les cas, l'acétate d'*alpha*-tocophérol a provoqué la mort des explantats.

I. — ROLE DE LA PHOTOPÉRIODE

Au cours de toutes nos expériences, les cultures étaient éclairées par une lumière artificielle dont la durée était réglée automatiquement. Pour produire la nuit complète, les lampes s'éteignaient et des rideaux noirs opaques descendaient de manière à envelopper les étagères sur lesquelles étaient disposées les cultures. Nous avions ainsi à notre disposition, dans la même salle, un dispositif produisant des jours longs de 18 heures et un autre produisant des jours courts de 10 heures qui nous a permis de déterminer les exigences photopériodiques de la mise à fleur des cultures de tissus d'endive.

1) Les cultures de fragments de racines d'endive gardent les exigences photopériodiques de l'espèce. — L'endive ayant besoin de jours longs pour fleurir, après une période de vernalisation par le froid (Hartman, 1956), nous avons préparé deux séries de cultures comparables que nous avons placées, l'une en régime de 18 heures, l'autre en régime de 10 heures de lumière. Les résultats donnés par le tableau XXXII et les deux premières lignes du tableau XXXIII indiquent nettement que la formation des boutons floraux n'a lieu qu'en régime de jours longs. Les exigences photopériodiques de la mise à fleurs des cultures sont donc du même type que celles des plantes entières, aucune floraison ne se produisant en journées courtes.

2) Détermination de la période de sensibilité maximum a la photopériode. — Nous avons ensuite essayé de déterminer si la journée longue était nécessaire pendant toute la durée des cultures, ou s'il existait une période critique hors de laquelle la longueur de la photopériode n'exerçait pas d'influence décisive sur la mise à fleurs. On sait en effet que, sur les plantes entières à exigences photopériodiques, la longueur de la photopériode a beaucoup moins d'importance une fois que le méristème est irréversiblement induit.

Nous avons transféré certaines séries de culture du régime de jours courts à celui de jours longs et vice-versa après des périodes de temps variables. Le tableau XXXIII donne les résultats obtenus. On remarque que, si l'on place les cultures d'abord en jours longs, puis en jours courts, on n'obtient pas de boutons floraux si les cultures ont été exposées moins de 14 jours aux jours longs. Avec 14 jours longs on commence à obtenir des bourgeons à fleurs. Inversement, si l'on place d'abord les cultures en jours courts pendant 10 jours au moins, puis en jours longs, un

TABLEAU XXXII

Influence de la photopériode sur la néoformation de boutons floraux chez Cichorium intybus *L. « Witloof »*

Milieux (Milieu S, 5 % saccharose)	Nombre de cultures :			Nombre total de bourgeons :		
	total	avec fleurs	%	végétatifs	floraux	%
Avec acide p-*coumarique* (3×10^{-5} *M*)						
— Jours longs de 18 h.	12	5	**42**	23	7	**30**
— Jours courts de 10 h.	12	0	**0**	7	0	**0**
Avec acide p-*coumarique* (10^{-4} *M*)						
— Jours longs de 18 h.	12	3	**25**	20	3	**15**
— Jours courts de 10 h.	12	0	**0**	15	0	**0**

TABLEAU XXXIII

Influence de divers traitements photopériodiques sur la néoformation de fleurs chez Cichorium intybus *L.* « *Witloof* ».

Traitements photopériodiques (1)	Nombre de cultures :			Nombre total de boutons floraux
	total	avec fleurs	%	
J. courts continuellement	12	0	**0**	0
J. longs continuellement	12	6	**50**	12
5 J. longs, puis J. courts	11	0	**0**	0
7 J. longs, puis J. courts	12	0	**0**	0
10 J. longs, puis J. courts	12	0	**0**	0
14 J. longs, puis J. courts	12	1	**8**	1
7 J. courts, puis J. longs	11	4	**36**	6
10 J. courts, puis J. longs	11	1	**9**	3
14 J. courts, puis J. longs	12	0	**0**	0
7 J.C., puis 7 J.L., puis J.C.	12	0	**0**	0
14 J.C., puis 7 J.L., puis J.C.	12	1	**8**	3

(1) Jours longs = 18 h. — Jours courts = 10 h.

certain nombre de bourgeons floraux se forment. Après cette période on n'obtient plus que des bourgeons végétatifs. Il semble donc que, pendant les 10 premiers jours de culture, la longueur de la photopériode influe peu sur le devenir végétatif ou floral des ébauches de bourgeons. C'est vers le 14e jour que la longueur du jour devient importante. La période d'induction florale peut être assez brève, une semaine environ. En effet, les deux dernières lignes du tableau XXXIII montrent que l'on peut obtenir quelques boutons floraux en jours courts à condition de donner une semaine de jours longs au bon moment, c'est-à-dire entre le 14e et le 21e jour de culture. Cette période est celle où les bourgeons se forment sur les cultures. On pourrait donc penser que l'induction photopériodique peut être ressentie par les cultures à partir du moment où apparaissent des méristèmes sur les tissus (et en l'absence de feuilles adultes), mais nous n'avons aucune preuve du lien qui pourrait exister entre ces deux phénomènes.

J. — APPLICATION A *NICOTIANA SUAVEOLENS* DES CONNAISSANCES ACQUISES AVEC L'ENDIVE SUR LA FORMATION DES FLEURS

1) Introduction. — Au cours de nos expériences sur le bourgeonnement végétatif de fragments de tiges de *Nicotiana suaveolens* provenant de plantes fleurissantes, nous avons obtenu sporadiquement la formation de boutons floraux (voir Pl. XI, fig. 2). Mme Aghion (communication personnelle) a également obtenu des fleurs de cette espèce en cultivant des fragments de hampe florale, mais sans pouvoir les obtenir de façon systématique.

Après avoir déterminé sur l'endive un certain nombre de facteurs chimiques qui favorisaient la néoformation de boutons floraux, nous avons cherché à appliquer les connaissances ainsi acquises au cas de *Nicotiana suaveolens*.

2) Absence d'auxine. — L'étude des conditions conduisant à la néoformation de fleurs chez l'endive ayant mis en relief l'action inhibitrice de l'auxine, nous n'avons employé, dans le cas de *N. suaveolens*, que des milieux sans auxine.

3) Effet de la concentration en saccharose. — Les travaux de Mme Aghion ont montré que, chez *Nicotiana tabacum* « Wisconsin 38 », la concentration en saccharose qui était la plus favorable à la néoformation de boutons floraux excédait celle qui était la plus favorable au bourgeonnement végétatif.

Or dans la Première Partie de ce travail, nous avons montré que, pour la néoformation de bourgeons végétatifs chez *N. suaveolens*, la concentration optimum de saccharose se situait aux alentours de 3% dans le cas de milieux dépourvus d'auxine. Nous avons augmenté nettement la concentration en saccharose, la faisant passer à 5 et 8%. Les résultats du tableau XXXIV montrent que l'on obtient 25% de cultures fleurissantes avec 8% de saccharose.

4) Effet de cytokinines. — Les travaux de Vardjan et Nitsch (1961), puis les nôtres (voir Première Partie), ont montré que les racines d'endive étaient riches en cytokinines. D'autre part, nous avons vu (voir tableau XXXI), que l'addition de kinétine pouvait provoquer la formation d'un certain nombre de fleurs sur des cultures de racines d'endive non vernalisées. Nous avons donc ajouté aux milieux pour *N. suaveolens* de la kinétine (0,1 et 1 mg/l). La première cencentration a provoqué la formation de 2 fleurs pour 12 cultures (tableau XXXIV).

5) Effet des composés phénoliques. — Les composés phénoliques tels que les acides *p*-coumarique et chlorogénique, ainsi que la coumarine, ont, nous l'avons vu, un effet nettement

TABLEAU XXXIV

Effet de diverses substances sur la néoformation de boutons floraux sur fragments de tiges de Nicotiana suaveolens

Résultats après 2 mois de culture

Milieux (Milieu S)	Nombre de cultures :		
	total	avec fleurs	%
5 % saccharose	12	0	**0**
8 % saccharose	12	3	**25**
5 % saccharose + kinétine 0,1 mg/l	12	2	**16**
5 % saccharose + kinétine 1 mg/l	12	0	**0**
5 % saccharose + acide *p*-coumarique $10^{-5}M$	12	3	**25**
5 % saccharose + acide chlorogénique $10^{-5}M$	12	2	**16**
5 % saccharose + coumarine 10^{-5} *M*	12	1	**8**
8 % saccharose + kinétine 0,1 mg/l + acide *p*-coumarique 10^{-5} *M*	12	7	**58**

stimulateur sur la néoformation des boutons floraux. Nous avons donc essayé ces trois composés, à la concentration de 10^{-5} *M*. Ainsi que l'indique le tableau XXXIV, chacun de ces composés a augmenté le pourcentage de cultures produisant des fleurs. Comme dans le cas de l'endive, c'est l'acide *para*-coumarique qui a été le plus efficace.

6) Effet combiné du saccharose, de la kinétine et de l'acide-para-coumarique. — En introduisant simultanément dans le milieu de culture :

a) une forte concentration en saccharose (8%),

b) de la kinétine (0,1 mg/l),

c) de l'acide *para*-coumarique (10^{-5} *M*),

nous avons pu élever jusqu'à 58% le pourcentage de cultures de *N. suaveolens* produisant des fleurs (tableau XXXIV).

Ces fleurs, comme toutes celles que nous avons obtenues étaient portées par des hampes florales feuillées (Pl. XI, fig. 2). Ce résultat contraste avec ceux que l'on obtient en partant de fragments de hampes florales de *N. tabacum* : dans ce cas les fleurs sont sessiles (Chouard et Aghion, 1961). Il semble que, lorsqu'on s'adresse à des tissus situés plus bas que la hampe florale (tissus de racines ou de tiges), les explantats aient à régénérer une partie des tissus intermédiaires avant de pouvoir former ceux de la fleur.

K. — DISCUSSION

La formation de boutons floraux pouvant se développer en fleurs normales, capables de donner des fruits et des graines viables, a été obtenue pour la première fois sur des cultures de hampes florales de tabac (Chouard et Aghion, 1961 ; Aghion, 1962). Ces auteurs ont montré que des tronçons de *hampes florales* étaient capables de régénérer des boutons floraux, tout comme des tronçons de tiges végétatives sont capables de régénérer des bourgeons végétatifs. Ces résultats ont été obtenus avec des variétés de *Nicotiana tabacum* indifférentes au photopériodisme, telles que « Wisconsin 38 », mais n'ont pu être étendus ni aux variétés photopériodiques de la même espèce, ni à un tabac de jours longs, le *Nicotiana sylvestris* (Aghion, 1962). Enfin, les explantats mis en culture étaient les tronçons *complets* de tige, comprenant moelle, tissu vasculaire, cambium, cortex et même épiderme.

Avec l'endive, les observations faites sur *Nicotiana tabacum* sont étendues à une autre famille, celle des Composées. De plus il s'agit précisément d'une espèce dont la floraison est régie par les facteurs climatiques (froid hivernal, photopériodisme) qui, chez les *Nicotiana*, semblaient condamner les expériences à l'échec. Enfin, nous avons obtenu les fleurs, non à partir de plantes déjà fleurissantes, ni à partir de tiges ou de tronçons complets de tiges, mais à partir des tissus de la *zone profonde* de *racines*, provenant de plantes encore *végétatives*. Toutes ces caractéristiques confèrent aux résultats obtenus avec l'endive un intérêt particulier dans les trois domaines suivants :

1) l'induction expérimentale de la formation de fleurs sur des cultures de tissus,

2) l'étude de la vernalisation,

3) la compréhension du rôle du photopériodisme dans l'induction florale.

Nous allons résumer rapidement les points touchant à ces trois domaines de recherches.

1) Induction expérimentale de la néoformation de fleurs : rôle du milieu de culture.

L'addition de diverses substances au milieu de culture nous a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs qui stimulent ou inhibent la néoformation de fleurs.

Une auxine telle que l'AIA a réduit invariablement à zéro le nombre de boutons floraux formés, même dans le cas où elle ne diminuait pas sensiblement le nombre de bourgeons végétatifs. (tableau XXVI). De fait, un pré-traitement de 10 jours sur un milieu contenant de l'AIA suffit à bloquer la différentiation de boutons floraux chez des cultures transférées ensuite sur un milieu

dépourvu d'auxine. Cet effet inhibiteur de l'AIA est à rapprocher de celui observé par Lona (1963) sur une plante entière : *Hydrophyllum virginicum*, plante de jours longs quantitative, dont la floraison est inhibée par des applications répétées d'AIA.

Par contre, la gibbérelline A_3, dont l'effet stimulateur sur la floraison des plantes de jours longs est bien connu (Doorenbos et Wellensiek, 1959) a eu un effet favorable sur la néoformation de fleurs, sauf aux concentrations élevées (tableau XXX). L'un des effets de l'acide gibbérellique sur les plantes est de produire, dans le métabolisme des composés phénoliques, des remaniements quantitatifs (Kögl et Elema, 1960) ou qualitatifs (Tronchet, 1959). Nous avons donc ajouté certaines de ces substances aux milieux de culture et obtenu, comme l'ont montré les tableaux XXVII et XXVIII, une augmentation du pourcentage des boutons floraux formés avec certains d'entre eux, en particulier l'acide *p*-coumarique à 10^{-5} *M*.

Il est intéressant de constater que, des trois isomères de l'acide coumarique, c'est l'isomère *para* qui a produit les effets les plus nets (tableau XXVIII). De fait, les deux autres isomères, employés à la même concentration molaire, n'ont pas augmenté le pourcentage des boutons floraux. Ce résultat pourrait être rapproché de l'effet de ces acides phénoliques sur le test mésocotyle (Nitsch et Nitsch, 1961) : sur ce test, l'acide *para*-coumarique est nettement plus inhibiteur que les deux autres isomères. Ceci laisse à penser que le rôle de l'acide *para*-coumarique sur la néoformation des boutons floraux pourrait être d'abaisser le niveau de l'AIA endogène (défavorable, comme nous l'avons vu, à l'initiation des méristèmes floraux). Les résultats obtenus avec la coumarine, autre inhibiteur de l'élongation des tiges, qui a stimulé l'apparition de boutons floraux, vont dans le même sens.

Les composés phénoliques ont probablement encore un autre rôle à jouer dans la formation des fleurs. En effet, si ces corps n'agissaient qu'en abaissant le niveau ou l'efficacité de l'auxine endogène, l'acide chlorogénique devrait avoir un effet inverse de celui de l'acide *p*-coumarique. Or les résultats du tableau XXVI montrent qu'il n'en est rien et que l'acide chlorogénique, ajouté aux milieux de culture (en l'absence d'AIA il est vrai) augmente la floraison, c'est-à-dire qu'il agit *dans le même sens* que l'acide *p*-coumarique.

Ce résultat est à rapprocher des analyses de Zucker, Nitsch et Nitsch (1965) qui ont montré que l'induction photo-périodique de la floraison chez *N. tabacum* variété « Maryland Mammoth » (variété de jours courts) et chez *N. sylvestris* (qui fleurit en journées longues), était accompagnée de modifications dans la teneur des feuilles en acides chlorogéniques (trois isomères : acides 3-

caffeoyl-, 4-caffeoyl-, et 5-caffeoyl-quinique). Chez ces deux types de *Nicotiana*, le traitement photopériodique provoque d'abord une augmentation de la teneur en acides chlorogéniques des feuilles. Puis, au moment de la transformation irréversible de l'apex en méristème floral, on assiste à une chute brusque du niveau des acides chlorogéniques dans les feuilles. Une fois les primordia floraux différenciés, le niveau de ces composés remonte dans les feuilles adultes.

Zucker, Nitsch et Nitsch ont avancé l'hypothèse que, au cours de l'induction florale, les précurseurs métaboliques des acides chlorogéniques seraient détournés au profit de la synthèse d'autres composés, nécessaires à l'élaboration des primordia floraux. De fait, nos résultats tendent à vérifier cette hypothèse. On sait, en effet, que l'acide *p*-coumarique est un précurseur de l'acide chlorogénique (Lévy et Zucker, 1960). D'autre part, la phénylalanine est un précurseur de l'acide *p*-coumarique (voir Neish, 1960). Il n'est donc pas étonnant que la phénylalanine agisse dans le même sens que l'acide *p*-coumarique (tableaux XXVIII et XXIX) Dans cette chaîne métabolique, l'acide *p*-coumarique sert de précurseur à l'acide chlorogénique. On peut ainsi concevoir pourquoi, dans nos expériences sur la floraison, l'acide *p*-coumarique agit dans le même sens que l'acide chlorogénique. Deux possibilités semblent ouvertes :

a) l'acide *p*-coumarique sert de précurseur à l'acide chlorogénique, lequel est directement employé dans le métabolisme conduisant à la floraison,

b) l'acide chlorogénique est dégradé en acide *p*-coumarique, lequel est employé dans le métabolisme floral.

Ces deux possibilités sont, l'une et l'autre, en accord avec les résultats de Zucker, Nitsch et Nitsch qui indiquent que le niveau endogène des acides chlorogéniques subit une brusque chute au moment de l'initiation florale.

Ainsi, les résultats obtenus avec les cultures d'endive permettent-ils d'attaquer l'étude des suites de réactions biochimiques qui caractérisent le métabolisme particulier des méristèmes floraux.

2) Contribution a la connaissance de la vernalisation.

a) *Les résultats obtenus vont à l'encontre des théories classiques.* — Certaines espèces, parmi lesquelles *Cichorium intybus*, ne peuvent être induites à fleurir qu'après un traitement par le froid, des graines ou des plantes entières, généralement de plusieurs semaines ou mois (Hartman, 1956 ; Lona, 1960 ; Michniewicz et Kamienska, 1964). A la fin de ce traitement, aucune ébauche n'est visible, mais la plante est capable d'être induite à fleurir par un traitement photopériodique approprié.

Des expériences récentes de Nitsch et Nitsch (1961) indiquent qu'il existe une hétérogénéité dans les populations obtenues par semis, ainsi que nous le signalions dans un chapitre précédent. Cependant, la grande majorité des plantes obtenues par graines ont un besoin absolu de froid pour produire des fleurs. De fait, dans le lot de plantes, récoltées de 1963, nous n'avons pas trouvé d'exception à la règle.

Les expériences de Melchers et Lang (1948) ont montré qu'un bourgeon de *Jusquiame*, pour être vernalisé, a besoin de subir *directement* l'action du froid. Des résultats analogues obtenu sur le céleri (Curtis et Chang, 1930), la betterave (Chroboczek; 1934), etc., ont fait admettre à beaucoup d'auteurs que seuls peuvent acquérir l'aptitude à fleurir les méristèmes qui ont subi directement l'action du froid ou qui dérivent de méristèmes ayant été vernalisés. Cette théorie à été résumée par Chouard en 1956 en ces termes : « Les bourgeons qui naîtraient, après vernalisation, par caulogénèse adventive à partir d'autres tissus, par exemple, d'une souche tubérisée, ne sont jamais vernalisés ». Les résultats que nous avons obtenus avec l'endive montrent, précisément, que des bourgeons qui sont nés « par caulogénèse adventive », « sur une souche tubérisée », sont parfaitement vernalisés.

De fait, dès 1956, les expériences de Oehlkers sur le *Streptocarpus Wendlandii* avaient démontré que des bourgeons formés de façon adventive *après* traitement par le froid pouvaient parfaitement être vernalisés. Le *Streptocarpus Wendlandii* est une plante particulière en ce sens qu'elle produit au cours de la première année, une grande feuille cotylédonnaire unique. Si l'on coupe cette feuille en boutures, chaque fragment régénère des bourgeons, lesquels sont végétatifs si la plante n'a pas été vernalisée, floraux si la plante a subi un traitement vernalisant (les boutons floraux, toutefois, ne se forment que sur des boutures provenant de la base des feuilles).

Depuis, Wellensiek (1961) a montré que l'on pouvait obtenir la vernalisation de boutures de feuilles de *Lunaria biennis* en appliquant le froid *pendant* que ces boutures étaient en train de régénérer racines et bourgeons. Il en a conclu que, si la présence d'un méristème apical n'était pas nécessaire, il était néanmoins indispensable que des divisions cellulaires aient lieu au sein des tissus pendant l'action du froid (Wellensiek, 1964 *a*).

Cette nouvelle théorie a été fortement entamée à son tour, par l'obtention de fleurs sur fragments de racines d'endive (Paulet et Nitsch, 1964 *a* et *b*) lesquelles avaient simplement été stockées intactes dans du sable à 0 °- 1 °C. Il est peu vraisemblable, en effet, que beaucoup de divisions cellulaires aient eu lieu pendant

le traitement à 0° - 1°C. Aussi, après avoir pris connaissances de nos résultats au Congrès International de Botanique d'Edimbourg (août 1964), WELLENSIEK a-t-il brusquement changé ses conclusions en affirmant le contraire (WELLENSIEK, 1964 *b*) de ce qu'il avait défendu quelques mois plus tôt (WELLENSIEK, 1964 *a*).

De notre côté, bien que l'examen de quelques coupes pratiquées dans la racine d'endive n'ait pas révélé de divisions cellulaires, nous ne pouvons être absolument certain qu'il n'y ait pas eu de divisions cellulaires dans les racines au cours de leur stockage à 0° - 1°C. Mais ce n'est là, peut-être, qu'une question académique. Le point important que nos expériences ont démontré est que des bourgeons néoformés sur un tissu vernalisé sont eux-mêmes vernalisés. Le problème qui se pose maintenant, et que d'autres auront à résoudre, est de savoir pourquoi ne fleurit pas un bourgeon non vernalisé greffé sur une racine vernalisée (cf. HARADA, 1962), alors que fleurissent, sur la même racine, des bourgeons néoformés.

b) *Possibilité d'accumulation d'une substance de floraison.* — On peut penser que s'accumule dans les racines, pendant le traitement par le froid, soit une substance de floraison, soit un précurseur de cette substance, du fait d'un changement dans l'équilibre enzymatique de ces tissus. Ces éventualités demandent à être étudiées expérimentalement.

Il n'en est pas moins vrai, comme l'a confirmé HARADA (1962) avec la rose-trémière, que le greffage d'un bourgeon non vernalisé sur une racine vernalisée ne permet pas l'induction de la floraison. On pourrait alors penser que le bourgeon non vernalisé tend à inactiver toute substance de floraison ou précurseur qui pourrait être fourni par la racine vernalisée.

Les résultats présentés dans ce travail ne sont pas toujours en accord avec les théories généralement admises pour expliquer la vernalisation. La culture des tissus, employée pour la première fois dans l'étude de ce phénomène, pourrait le faire apparaître sous un jour nouveau.

3) CONTRIBUTION AUX CONNAISSANCES SUR LE PHOTOPÉRIODISME :

Les résultats présentés dans les tableaux XXXII et XXXIII montrent que des cultures de tissus gardent la même exigence photopériodique que la plante entière. Ils suggèrent la présence d'au moins trois phases dans la sensibilité aux jours longs :

1) une période d'environ une semaine, où la culture est insensible à la longueur du jour ;

2) une période critique, correspondant à la deuxième semaine de culture, pendant laquelle le stimulus est ressenti (phase qui

semble correspondre à la période d'initiation des méristèmes) ;

3) une période de croissance des bourgeons, peu sensible à la longueur du jour.

Ces expériences montrent aussi que la présence des feuilles adultes n'est pas nécessaire à la perception du stimulus photopériodique dans le cas des cultures d'endive.

IV. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

RÉSUMÉ DES INTERACTIONS DES SUBSTANCES ÉTUDIÉES CONDUISANT AUX PHÉNOMÈNES D'ORGANOGÉNÈSE

La discussion des résultats que nous avons obtenus sur les facteurs qui règlent la néoformation soit des bourgeons végétatifs, soit des bourgeons floraux, se trouve à la fin de chacune des deux principales parties de ce mémoire. Nous ne reviendrons donc pas sur les points de détail.

Au contraire, ainsi qu'il a été indiqué dans l'Introduction, nous tenterons d'unifier certaines des conclusions auxquelles les résultats expérimentaux nous ont conduit et certains points acquis par d'autres expérimentateurs en une hypothèse générale sur les interactions de substances qui conduisent aux phénomènes d'organogénèse : formation de racines, de bourgeons végétatifs ou de boutons floraux.

Il semble exister une sorte de gradation dans les effets morphogènes d'une même substance selon sa concentration. Dans le cas de l'auxine, par exemple, on verra sur le même tissu de tige de *N. suaveolens*, se développer des racines si la concentration est relativement forte et si l'effet est amplifié par une substance à caractère synergique, comme l'acide chlorogénique ou la rutine. En l'absence de ces composés phénoliques, apparaîtront des bourgeons, même si le milieu contient encore une quantité modérée d'auxine. Enfin, pour obtenir des fleurs, il faudra supprimer toute auxine du milieu.

Une sorte de progression inverse se produit pour la concentration en sucres. Ainsi que l'a montré Nitsch (1954) par exemple, sur des pédoncules floraux de tomate, des concentrations relativement faibles de saccharose (de l'ordre de 1 à 2%) favorisent au maximum la néoformation de racines. Lorsque la concentration en saccharose augmente, la néoformation des racines est progressivement inhibée. La néoformation de bourgeons végétatifs chez *N. suaveolens*, au contraire, est favorisée par des concentrations de l'ordre de 5% qui inhibent la formation des racines. Si l'on augmente davantage encore la teneur en saccharose, on réduit le bourgeonnement végétatif, mais on encourage la formation des boutons floraux.

Le cas des cytokinines est plus nuancé. Ainsi que l'ont montré Skoog et Miller (1957), l'effet produit par ces substances dépend du niveau d'auxine. Nos résultats sont en accord avec ce point de vue. Ils tendent à montrer, de plus, que les cytokinines, telle la kinétine, sont de véritables substances de bourgeonnement car elles seules ont été capables d'augmenter de façon spectaculaire le nombre de bourgeons néoformés (environ 300 avec 1 mg/l de kinétine contre 32 sans kinétine, chez *N. suaveolens* : tableau XXII). Les autres substances puriques ou pyrimidiques qui augmentent aussi le bourgeonnement, mais dans des proportions plus faibles, auraient principalement pour effet de contrebalancer l'effet inhibiteur de l'auxine.

Enfin certains autres facteurs, tels que les composés phénoliques, peuvent amplifier les effets des sucres ou de l'auxine.

TABLEAU XXXV

Résumé des interactions de substances conduisant aux phénomènes d'organogénèse.

Le nombre de + indique l'intensité de la concentration.

Organogénèse de	Favorisée par des concentrations en :			
	glucides	auxines	composés phénoliques	cytokinines
Boutons floraux	+++	0	++	+
Bourgeons végétatifs	++	±	?	+++
Racines	+	+++	+++	0

Le tableau XXXV résume les interactions de ces substances dans les phénomènes d'organogénèse. On en déduit que :

a) une faible concentration en glucides, une forte concentration en auxine et en composés phénoliques synergistes conduisent (en l'absence de kinétine) à une forte production de *racines* ;

b) une concentration plus élevée en glucides, mais très faible en auxines, des bases puriques et pyrimidiques et, surtout une dose relativement élevée en cytokinines conduisent à la production de *bourgeons végétatifs* ;

c) une teneur plus élevée encore en glucides, l'absence totale d'auxine, la présence de composés phénoliques du type *para-*

coumarique, et une dose modérée de cytokinines conduisent à la production de *boutons floraux*.

Ce schéma n'est, bien entendu, qu'une grossière simplification des équilibres de substances qui règlent les phénomènes d'organogénèse. Il a l'avantage, cependant, de résumer la plupart des résultats présentés dans ce mémoire.

En tout cas, les résultats de nos recherches, tant sur le plan analytique que sur celui de l'expérimentation *in vitro*, ont permis, en particulier, d'induire la néoformation de bourgeons sur un tissu qu'on n'avait pu, semble-t-il, faire bourgeonner jusqu'ici : la tige de *Nicotiana glauca*. Ils ont permis, enfin, de mettre au point une méthode capable de faire former un nombre relativement élevé de boutons floraux sur des cultures soit de *Cichorium intybus*, soit de tige de *N. suaveolens*.

Ces résultats montrent que la technique de culture des tissus végétaux apporte un mode d'expérimentation commode dans un domaine où elle n'avait encore guère pénétré : la physiologie de la floraison.

BIBLIOGRAPHIE

Aghion (D.), 1962. — Conditions expérimentales conduisant à l'initiation et au développement de fleurs à partir de la culture stérile de fragments de tiges de tabac. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **255**, p. 993-995.

Andreae (S.R.) et Andreae, (M.A.), 1949. — The metabolism of scopoletin by healthy and virus infected potato tuber. *Can. Journ. Research*, C. **27**, p. 15-22.

Baldev (B.), 1959. — *In vitro* responses of growth and development in *Cuscuta reflexa* Roxb. *Phytomorphology*, **9**, p. 316-319.

Bessman (M.J.), Lehman (J.R.), Adler (J.), Zimmerman (S.B.), Simms (E.S.) et Kornbert (A.), 1958. — Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. III. The incorporation of pyrimidine and purine analogues in deoxyribonucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Washington), **44**, p. 633-640.

Best (R.J.), 1936. — Studies on a fluorescent substance present in plants. I. Production of the substance as a result of virus infection and some application of the phenomenon. *Austr. Journ. Exp. Biol. Med. Sci.*, **14**, p. 199-213.

Best (R.J.), 1944. — Studies on a fluorescent substance present in plants. II. Isolation of the substance in a pure state and its identification at 6-methoxy-7-hydroxy-1 : 2-benzopyrone. *Austr. Journ. Exp. Biol. Med. Sci.*, **22**, p. 251-255.

Bonner (J.), et Zeevaart (J.A.D.), 1962. — Ribonucleic acid synthesis in the bud an essential component of floral induction in *Xanthium*. *Plant Physiol.*, **37**, p. 43-49.

Bouillenne (R.) et Prévot (P.), 1932. — Note préliminaire sur les phénomènes de néoformation chez *Begonia rex* Putz. *C.R. Soc. belge de Biol.*, **111**, p. 639.

Bouillenne (R.) et Prévot (P.). 1934. — Recherches expérimentales sur les phénomènes de néoformation chez *Begonia rex* Putz. *Bull. Acad. Roy. Belgique, classe Sc.*, 5e série, **20**, p. 639-643.

Bouillenne (R.) et Prévot (P.), 1934. — Recherches expérimentales sur les phénomènes de néoformation chez *Begonia rex* Putz. *Bull. Acad. Roy. Belgique, classe Sc.*, 5e série, **20**, p. 723-737.

Brian (P.W.) et Hemming (H.G.), 1958. — Complementary action of gibberellic acid and auxins in pea internode extension. *Ann. Bot. N.S.*, **22**, p. 1-17.

Bruinsma (J.) et Patil (S.S.), 1963. — The effects of 3-indoleacetic acid, gibberellic acid and vitamin E on flower initiation in unvernalized Petkus winter rye plants. *Naturwiss.* **50**, p. 505.

Buvat (R.), 1944-45. — Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. Thèse, Paris, 228 p., et *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.*, **5**, p. 1-130, et **6**, p. 1-119.

Camus (G.), 1949. — Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse. Thèse Paris, 119 p. et *Rev. Cytophysiol. Biol. vég.*, **11**, p. 1-195.

Chailakhian (M.K.). 1961. — Effect of gibberellins and derivates of nucleic acid metabolism on plant growth and flowering. *In* : Plant growth regulation. Iowa Ed. R.M. Klein et al., p. 531-542.

Chouard (P.), 1938. — Production expérimentale de bourgeons sous l'effet d'hétéro-auxine. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **206**, p. 1401-1403.

CHOUARD (P.), 1956. — Exposé introductif sur les problèmes de la vernalisation. *Bull. Soc. Française Physiol. vég.*, **2**, p. 125-136.

CHOUARD (P.), 1960. — Vernalization and its relations to dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11**, p. 191-238.

CHOUARD (P.) et AGHION (D.), 1961. — Modalités de la formation de bourgeons floraux sur des cultures de segments de tiges de tabac. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **252**, p. 3864-3866.

CHROBOCZEK (E.), 1934. — A study of some ecological factors influencing seed-stalk development in beets (*Beta vulgaris* L.). *Cornell Agric. Exp. Sta. Mem.*, **154**, p. 1-84.

CURTIS (O.F.) et CHANG (H.T.), 1930. — The relative effectiveness of the temperature of the crown as contrasted with that of the rest of the plant upon the flowering of the celery plant. *Am. Journ. Bot.*, **17**, p. 1047-1048.

DANCKWARDT-LILLIESTRÖM (C.). 1957. — Kinetin induced shoot formation from isolated roots of *Isatis tinctoria*. *Physiol. Plant.*, **10**, p. 794-797.

DAS (N.K.), PATAU (K.) et SKOOG (F.), 1956. — Initiation of meiosis and cell division by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, **9**, p. 640-651.

DAWSON (R.F.) et WADA (E.), 1957. — Flavonoids and depsides of green tobacco leaves. I. Rutin and chlorogenic acid. *Tobacco Science*, **1**, p. 57-60.

DOORENBOS (J.) et WELLENSIEK (S.J.), 1959. — Photoperiodic control of floral induction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **10**, p. 147-184.

DORE (J.), 1965. — Physiology of regeneration in cormophytes. *Encycl. Plant Physiol.*, W. Ruhland ed., **15** (II), p. 1-91.

DUARTE (I.), SPANGERSBERG (G.) et GAUTHERET (R.), 1963. — Remarques sur la transformation tumorale des tissus de Tabac cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **257**, p. 2782-2784.

EHRLICH (P.), 1903. — Deutsche Mediz. Wochenschr. (cité par SCHMIDT, 1903, **1**, p. 1443).

ELIASON (L.), 1961. — The influence of growth substances on the formation of shoots from aspen roots. *Physiol. Plant.*, **14**, p. 150-156.

GAUTHERET (R.J.), 1940 *a*. — Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **210**, p. 632-631.

GAUTHERET (R.J.), 1940 *b*. — Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci*, Paris, **210**, p. 744-746.

GAUTHERET (R.J.), 1941 *a*. — Recherches expérimentales sur la polarité des tissus de la racine d'endive. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **213**, p. 37-39.

GAUTHERET (R.J.), 1941 *b*. — Caractères anatomiques et cytologiques des tranches d'Endive, Salsifis et Topinambour, cultivés *in vitro*. *C.R. Soc. Biol.*, **135**, p. 1161-1164.

GAUTHERET (R.J.), 1942 *a*. — Remarques sur le développement de fragments de tissus d'endive cultivés *in vitro*. *C.R. Soc. Biol.*, **136**, p. 341-342.

GAUTHERET (R.J.), 1942 *b*. — Le bourgeonnement des tissus végétaux en culture. *Science*, **40**, p. 96-128.

GAUTHERET (R.J.), 1944 *a*. — Sur une méthode histologique permettant de mettre en évidence la circulation polarisée de l'acide indolylacétique. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **219**, p. 193-195.

GAUTHERET (R.J.), 1944 *b*. — Recherches sur la polarité des tissus végétaux. *Rev. Cytol. Cytophysiol. vég.*, **7**, p. 45-297.

GAUTHERET (R.J.), 1955. — Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, **62**, p. 5-112.

GAUTHERET (R.J.), 1959. — La culture des tissus végétaux. Masson Ed., Paris.

GAUTHERET (R.J.), 1964. — La culture des tissus végétaux : son histoire, ses tendances. *Rev. Cyt. Biol. vég.*, **27**, p. 99-220.

Gordon (S.A.) et Weber (R.P.), 1951. — Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, **26**, p. 192.

Goris (A.), 1950. — Influence comparée de l'acide indole-acétique et du lait de Coco sur les réserves glucidiques de souches de tissu de Carotte. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **231**, p. 870-872.

Goris (A.), 1954. — Transformations glucidiques intratissulaires. *Ann. Biol.*, **30**, p. 297-318.

Goris (A.) et Duhamet (L.), 1958. — Etude de l'action du lait de Coco sur la croissance et la composition glucidique des tissus végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, **65**, p. 5-48.

Hanson (K.R.) et Zucker (M.), 1963. — The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxy-cinnamic acids. *Journ. of Biolog. Chem.*, **238**, p. 1105-1115.

Harada (H.), 1962. — Etude des substances naturelles de croissance en relation avec la floraison. Isolement d'une substance de montaison. Thèse Paris, 106 p. et *Rev. Gén. Bot.*, **69**, p. 201-297.

Hartman (T.A.), 1956. — After effect of low temperature on leaf morphology of *Cichorium intybus* L. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* Amsterdam, *C*, **59**, p. 677-680.

Hartsema (A.M.), 1924. — Over het Anstaan van sekundaire Meristem op de Bladeren van *Begonia rex*. Thèse. Utrecht Amsterdam, 74 p.

Hartsema (A.M.), 1926. — Anatomische und experimentelle Untersuchungen über das Auftreten von Neubildung an Blättern von *Begonia rex*. *Rec. Trav. bot. neerl.*, **23**, p. 305.

Heinrich (M.R.), Denvey (V.C.), Parks (Jr R.E.) et Kidder (G.W.), 1952. — The incorporation of 8-azaguanin into the nucleic acids of *Tetrahymena geleii*. *Journ. Biol. Chem.*, **197**, p. 199-204.

Heller (R.), 1953. — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Thèse Paris, 223 p. et *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. vég.*, **14**, p. 1-223.

Henderson (J.H.M.) et Nitsch (J.-P.), 1962. — Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxines and tryptophan. *Nature*, **195**, p. 780-782.

Henrickson (C.E.), 1954. — The flowering of sunflower explants in aseptic culture. *Plant Physiol.*, **29**, p. 536-538.

Hoepfner (N.), 1932. — Zwei neue Reaktionen für Caffeesäure und Chlorogensäure. *Chemiker Zeitung*, **56**, p. 991.

Jacquiot (C.), 1951. — Action du méso-inositol et de l'adénine sur la formation des bourgeons par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **233**, p. 815-817.

Jurd (L) et Horowitz (R.M.), 1957. — Spectral studies on flavonols. The structure of azalein. *Journ. Org. Chem.*, **22**, p. 1019.

Kögl (F.) et Elema (J.), 1960. — Wirkungsbeziehungen Zwischen Indol-3-essigsäure und Gibberellinsäure. *Naturwiss.*, **47**, p. 90.

Kuse (G.), 1958. — Necessity of auxin for the growth effect of gibberellin. *Bot. Mag.*, **71**, p. 151-159.

La Motte (C.E.), 1960. – The effects of tyrosine and other amino acids on the formation of buds in tobacco callus. Thèse, University of Wisconsin.

Lang (A.), 1961. — Auxins and flowering. *Handbuch Pflantzenphysiol.*, W. Rhuland ed., **14**, p. 909-950.

Lang (A.), 1965. — Physiology of flower initiation. *Encycl. Plant Physiol.*, W. Ruhland ed., Springer, **15** (1), p. 1380-1536.

Lee (T.T.), 1962. — Effects of substituted phenols on growth, bud formation and indoleacetic acid oxidase activity in tobacco tissue culture. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin.

Levine (M.), 1950. — The growth of normal plant tissue *in vitro* as affected by chemical carcinogenese and plant growth substances. III : The culture of sunflower and tobacco stem segments. *Bull. Torrey Bot. Club*, **77**, p. 110-132.

Levy (C.C.) et Zucker (M.), 1960. — Cinnamyl and *p*-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acids. *Journ. Biol. Chem*, **235**, p. 2418-2425.

Lona (F.), 1960 (1962). — Ontogenetical sites of gibberellin-like manifestations. *In* : Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline, R. Knapp ed., Springer, p. 76.

Lona (F.), 1963. — Reazione morfogenetica di *Hydrophyllum virginicum* a fattori luminosi ed ormonale. *Giorn. Bot. Ital.*, **70**, p. 553-560.

Lona (F.), 1963. — La brevidiurna *Impatiens balsamina* stimolata alla fioritura dalla gibberelline ed inibita dall'acido indol-acetico. *Ateneo Parmense*, **34**, p. 715-718.

Loo (S.W.), 1946. — Cultivation of excised stem tips of dodder *in vitro*. *Amer. Jour. Bot.*, **33**, p. 295-300.

Margara (J.), 1965. — Comparaison *in vitro* du développement de bourgeons de la tige florifère de *Cichorium intybus* L. et de l'évolution de bourgeons néoformés. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **260**, p. 278-281.

Mayer (L.), 1956. — Wachstum und Organbildung an *in vitro* kultivierten Segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*. *Planta*, **47**, p. 401-446

Melchers (G.) et Lang (A.), 1948. — Die Physiologie der Blütenbildung. *Biol. Zentralbl.*, **67**, p. 105-164.

Michniewicz (M.), et Kamienska (A.), 1964. — Flower formation induced by kinetin and vitamin E treatment in cold-requiring plant (*Cichorium intybus* L.) grown under non-inductive conditions. *Naturwiss*, **51**, p. 295-296.

Miller (C.O.) et Skoog (F.), 1953. — Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *Am. Journ. of. Bot.*, **40**, p. 768-773.

Miller (C.O.), Skoog (F.), Okumura (F.S.), Von Saltza (M.H.) et Strong (F.M.), 1956. — Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journ. Am. Chem. Soc.*, **78**, p. 1375-1380.

Motamed (M.), 1964. — Contribution à l'étude des propriétés organogènes de quelques plantes en culture aseptique. Thèse 3e Cycle, Paris, 84 p.

Mothes (K,), 1963. — The role of kinetin in plant regulation. *In* : Régulateurs naturels de la croissance végétale. Colloque intern. C.N R.S., Paris, p. 131-140.

Murashige (T.), 1961. — Suppression of shoot formation in cultured tobacco stems by gibberellic acid. *Science*, **134**, p. 280.

Murashige (T.), 1964. — Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiol. Plantarum*, **17**, p. 636-643.

Murashige (T.), et Skoog (F.), 1962. — A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, p. 473-497.

Neish (A.C.) 1960. — Biosynthetic pathways of aromatic compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11**, p. 55-80.

Nitsch (J.-P.), 1954 — Action du jus de Tomate sur la croissance de certains tissus et organes végétaux. *Bull. Soc. Bot France*, **101**, p. 433-440.

Nitsch (J.-P.) 1963. — The *in vitro* culture of flowers and fruits. *In* : Plant tissue and organ culture. A symposium P. Maheshwari and N.S. Ranga Swamy ed., p. 198-214.

Nitsch (J.-P.) et Nitsch (C.), 1955. — The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. *Beitr. Biol. Pfl.*, **31**, p. 387-408.

Nitsch (J.-P.) et Nitsch (C.), 1956. — Studies in the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiol.*, **31**, p. 94-111.

Nitsch (J.-P.) et Nitsch (C.), 1957. — Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. II. *Am. Journ. Bot.*, **44**, p. 555-564.

Nitsch (J.-P.) et Nitsch (C.), 1959. — Synergie d'action entre les dérivés de l'acide chlorogénique et l'acide 3-indolyl-acétique. *Bull. Soc. Bot. France*, **106**, p. 414-417.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.), 1959 (1961). — Growth factors in the tomato fruit. *In* : Plant Growth Regulation, Iowa State *Univ. Press*, p. 687-705.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.), 1961. — Synergistes naturels des auxines et gibbérellines. *Bull. Soc. Bot. France*, **108**, p. 349-362.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.). 1962 — Activités comparées de neuf gibbérellines sur trois tests biologiques. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, p. 85-97.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.), 1964. — Néoformation de boutons floraux sur cultures *in vitro* de feuilles et de racines de *Cichorium intybus* L. Existence d'un état vernalisé en l'absence de bourgeons. *Bull. Soc. Bot. France*, **111**, p. 299-304.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.), 1965 *a*. — The induction of flowering in *Nicotiana*. III. Variations in the level of endogenous growth substances. *Amer. Jour. Bot.*, **52**, p. 591-598.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.), 1965 *b*. — Présence d'une phytokinine dans le cambium. *Bull. Soc. Bot. France*, **112**, p. 1-10.

NITSCH (J.-P.) et NITSCH (C.), 1965 *c*. — Présence de phytokinines et autres substances de croissance dans la sève d'*Acer saccharum* et de *Vitis vinifera*. *Bull. Soc. Bot. France*, **112**, p. 11-18.

OEHLKERS (F.), 1956. — Veränderungen in der Blühbereitschaft vernalisierten Cotyledonen von Streptocarpus, kenntlich gemacht durch Blattstecklinge. *Zeit. Naturf.*, **11**b, p. 471-480.

PAULET (P.), 1960. — La stimulation chimique du bourgeonnement chez *Cardamine pratensis* L. Dipl. Et. Sup. Univ. Paris, 39 p.

PAULET (P.) et LIORET (C.), 1965. — La néoformation de bourgeons chez *Nicotiana* : sensibilité aux composés phénoliques externes ; insensibilité aux composés phénoliques internes. Coll. intern. Phytohormones et Organogénèse, Liège (sous presse).

PAULET (P.) et NITSCH (J.-P.), 1959. — Stimulation chimique du bourgeonnement chez *Cardamine pratensis* L. *Bull. Soc. Bot. France*, **106**, p. 425-441.

PAULET (P.) et NITSCH (J.-P.), 1963. — Etude préliminaire du bourgeonnement *in vitro* de *Nicotiana glauca*, *N. suaveolens* et leur hybride. *Bull. Soc. Bot. France*, **110**, p. 361-366.

PAULET (P.) et NITSCH (J.-P.), 1964 *a*. — Néoformation de fleurs *in vitro* sur des cultures de tissus de racine de *Cichorium intybus* L. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **258**, p. 5952-5955.

PAULET (P.) et NITSCH (J.-P.), 1964 *b*. — La néoformation de fleurs sur cultures *in vitro* de racines de *Cichorium intybus* L. : étude physiologique. *Ann. Physiol. vég.*, **6**, p. 333-345.

PAVILLARD (J.) et BEAUCHAMP (C.), 1957. — La constitution auxinique de tabacs sains ou atteints de maladies à virus : présence et rôle de la scopolétine. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **244**, p. 1240-1243.

PHINNEY (B.O.), 1956. — Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S.A., **42**, p. 185-189.

PILET (P.-E.), 1961. — Effect of chlorogenic acid on the auxin catabolism and the auxin content of root tissue. *Phytochemistry*, **3**, p. 617-621.

PRÉVOT (P.), 1935. — La néoformation des bourgeons chez *Begonia rex* Putz. *C.R. Soc. Biol., Soc. belge Biol.*, **120**, p. 797.

PRÉVOT (P.), 1936. — La néoformation des bourgeons chez *Begonia rex* Putz. *C.R. Soc. Biol., Soc. belge Biol.*, **121**, p. 881.

PRÉVOT (P.), 1937. — Influence de l'engrais « Colombine » sur la néoformation des bourgeons chez *Begonia rex* Putz. *Bull. Soc. Roy. Sci.* Liège, **12**.

PRÉVOT (P.), 1938. — Influence de l'hétéro-auxine (3-IAA) sur la néoformation des bourgeons chez *Begonia rex*. *Bull. Soc. Roy. Sci.* Liège, **7**, p. 284-288.

PRÉVOT (P.), 1939 *a*. — La néoformation des bourgeons chez les végétaux. *Mém. Soc. Roy. Sci.* Liège, 4e série, **3**, p. 173-340.

Prévot (P.), 1939 *b*. — Les facteurs de la morphogénèse des bourgeons de néoformation chez *Begonia rex*. *Assoc. française, p. avanc. Sc.*, 63e session, p. 611-619. Liège.

Prevot (P.) et Bouillenne (R.), 1933. — Recherches expérimentales sur les phénomènes de néoformation chez *Begonia rex* Putz. *Acad. Roy. Belgique, Bull., cl. Sci.*, 5e série, **19**, p. 8-9.

Rabin (R.S.) et Klein (R.M.), 1957. — Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indole-acetic acid oxidase. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **70**, p. 11-15.

Raghavan (V.) et Jacobs (W.P.), 1961. — Studies on the floral histogenesis and physiology of *Perilla*. II. Floral induction in cultured apical buds of *P. frutescens*. *Am. Journ. Bot.*, **48**, p. 751-760.

Rappaport (L.) et Bonner (J.), 1960. — Interactions of gibberellin, vernalization, photoperiod and temperature in the flowering of Endive. *Plant-Physiol.*, **35**, p. 98-102.

Robinson (B.J.), 1951. — A relationship between indoleacetic acid effects upon growth and carbohydrate concentration in tobacco stem segments cultured *in vitro*. Thèse, Wisconsin, 95 p.

Sargent (J.-A.) et Skoog (F.), 1960. — Effects of indoleacetic acid and kinetin on scopoletin-scopolin levels in relation to growth of tobacco tissues *in vitro*. *Plant Physiol.*, **35**, no 6, p. 934-941.

Sargent (J.A.) et Skoog (F.), 1961. — Scopoletin glucosides in tobacco tissue. *Physiol. Plant.*, **14**, p. 504-519.

Segretain (G.), 1941. — Formation de cals en milieu aseptique à partir de fragments de tige de tabac. *C.R. Soc. Biol.*, **155**, p. 648-649.

Sironval (C.), 1954. — Sur le chimisme propre à l'accomplissement de la photophase et sur l'existence d'extraits favorisant la formation de fleurs. 8e Congrès Int. Botanique, **11**, p. 328-329.

Skoog (F.), 1944. — Growth and organ formation in tobacco tissue culture. *Amer. Jour. of. Bot.*, **31**, p. 19-24.

Skoog (F.), 1950. — Chemical control of growth and organ formation in plant tissues. *Ann. Biol.*, **26**, p. 545-562.

Skoog (F.), 1954. — Substances involved in normal growth and differenciation of plants. Brookhaven Symposia in Biology, **6**, p. 1-21.

Skoog (F.), 1955. — Chemical control of growth and organ formation in plant tissues. *Ann. Biol.*, **31**, fasc. 1, 2, 3, 4, p. 201-213.

Skoog (F.) et Miller (C.O.), 1957. — Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. of Soc. Exp. Biol.* **11**, p. 118-131.

Skoog (F.) et Robinson (B.J.), 1950. — A direct relationship between indoleacetic acid effects on growth and reducing sugar in tobacco tissue. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **74**, p. 565-568.

Skoog (F.), Strong (F.M.) et Miller (C.O.), 1965. — Cytokinins. *Science*, **148**, p. 532-533.

Skoog (F.) et Tsui (C.), 1948. — Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Amer. Jour. of Bot.*, **35**, p. 782-787.

Stichel (E.), 1959. — Gleichzeitige Induktion von Sprossen und Wurzeln an *in vitro* Kultivierten Gewebestüken von *Cyclamen persicum*. *Planta*, **53**, p. 293-317.

Stoughton (R.H.) et Plant (N.), 1938. — Regeneration of root-cuttings as influenced by plant hormones. *Nature*, **142**, p. 293-294.

Sutherland (G.K.), 1959. — Preliminary classification of some naturally occuring hydroxycinnamic acids through their ultraviolet spectra. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, p. 412-417.

Tomaszewski (M.), 1963. — The mecanism of synergistic effects between auxin and some natural phenolic substances. *In* : Régulateurs naturels de la croissance végétale. Colloque Intern. C.N.R.S., Paris, p. 335-351.

TORREY (J.G.), 1958. — Endogenous bud and root formation by isolated roots of *Convolvulus* grown *in vitro*. *Plant Physiol.*, **33**, n° 4, p. 258-263.

TRONCHET (J.), 1959. — Etude par chromatographie sur papier des flavonoïdes de *Convolvulus sepium* dans les flagelles volubiles, les tiges rampantes et les tiges rampantes devenues volubiles par traitement gibbérellique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Doubs*, **62**, p. 101-104.

TRYON (K.), 1956. — Scopoletin in differentiating and non differentiating cultured tobacco tissues. *Science*, **123**, p. 590.

VARDJAN (M.) et NITSCH (J.-P.), 1961. — La régénération chez *Cichorium endivia* L. : étude des auxines et des « kinines » endogènes. *Bull. Soc. Bot. France*, **108**, p. 363-374.

WARDLAW (C.W.), 1965. — The organization of the shoot apex. *Encycl. Plant Physiol.*, **15** (1), p. 966-1076.

WARMKE (H.E.) et WARMKE (G.L.), 1950. — The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of *Taraxacum* and *Cichorium*. *Amer. Jour. Bot.*, **37**, p. 272-280.

WATERKEYN (L.), MARTENS (P.) et NITSCH (J.-P.), 1965. — The induction of flowering in *Nicotiana*. I. Morphological development of the apex. *Amer. Jour. Bot.*, **52**, p. 264-270.

WELLENSIEK (S.J.), 1961. — Leaf vernalization. *Nature*, **192**, p. 1097-1098.

WELLENSIEK (S.J.), 1964 *a*. — Dividing cells as the prerequising for vernalization. *Plant Physiol.*, **39**, p. 832-835.

WELLENSIEK (S.J.), 1964 *b*. — Root vernalization of *Cichorium intybus* L. *Kon. Nederl. Akad. van Wetensch.* Amsterdam, **67**, p. 307-312.

WHITE (P.R.), 1939. — Controlled differenciation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, **66**, p. 507-513.

WIGGANS (S.C.), 1954. — Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. *Amer Jour . Bot.*, **41**, p. 321-326.

WURM (G.), 1960. — Vergleischende Untersuchungen über Wachstum und Organbildung an Segmenten pflantzlicher Speicherorgane bei Kultur *in vitro*. *Flora*, **149**, p. 43-76.

ZENK (M.H.), 1961. — 1-(Indole-3-acetyl) - β - D - glucose, a new compound in the metabolism of indole-3-acetic acid in plants. *Nature*, **131**, p. 493-494.

ZENK (M. H.), 1963. — Isolation, biosynthesis and function of indoleacetic conjugates. *In* : Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. Int. C.N.R.S., Paris, p. 241-249.

ZUCKER (M.) et AHRENS (J. F.), 1958. — Quantitative assay of chlorogenic acid and its pattern of distribution within tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **33**, p. 246-249.

ZUCKER (M.), NITSCH (C.) et NITSCH (J.-P.), 1965. — The induction and flowering in *Nicotiana*. II. Photoperiod alteration of the chlorogenic acid concentration. *Amer. Journ. Bot.*, **52**, p. 271-277.

ZWAR (J.A.), BRUCE (M. I.), BOTTOMLEY (W.) et KEFFORD (N. P.), 1963. — A comparison of the kinins of apple and coconut milk and of the modifications produced by purification precedures. *In* : Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S., Paris, p. 123-130.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 7

INTRODUCTION 9

I. — **HISTORIQUE** :

1) Premières études concernant la régulation chimique de la néoformation des bourgeons. 11
2 Contribution de la méthode de culture *in vitro* aux recherches sur la néoformation des bourgeons. 12
3) La néoformation de fleurs en cultures de tissus 14

II. — **MATÉRIEL ET TECHNIQUES** :

1) Matériels végétaux. 17
2) Culture des tissus végétaux 17
3) Techniques d'extraction 18
4) Méthode de chromatographie 19
5) Tests biologiques. 20
6) Dosage des sucres dans les deux espèces de *Nicotiana* et leur hybride. 20
7) Dosage de l'acide chlorogénique. 20
8) Mode de présentation des résultats. 21
9) Analyse statistique de la répartition des cultures en classes d'après le nombre de bourgeons formés. 21
10) Etude statistique du rôle de la « vigueur » des cultures dans l'intensité du bourgeonnement. 25

III. — **RÉSULTATS** :

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES SUR LA NÉOFORMATION DES BOURGEONS VÉGÉTATIFS :

A) Position du problème. 29
B) La néoformation des bourgeons chez *Nicotiana glauca*, *N. suaveolens* et leur hybride. 30
C) Action des bases puriques et pyrimidiques et de leurs analogues. 31
D) Etude des principaux composés phénoliques des trois *Nicotiana* : leur rôle dans le bourgeonnement. 39
E) Effet de l'auxine sur le bourgeonnement. Etude des substances de ce type contenues dans les trois *Nicotiana*. 47
F) Effet des cytokinines sur le bourgeonnement des trois *Nicotiana*. 53
G) Effet des glucides sur le bourgeonnement des trois *Nicotiana* 56
H) Stimulation du bourgeonnement *in vitro* de fragments de tiges de *N. glauca*. 61
I) Discussion 62

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LA NÉOFORMATION DE BOUTONS FLORAUX :

A) Observation d'un phénomène nouveau : la néoformation de boutons floraux sur cultures de racine de *Cichorium intybus* L. 69
B) Influence de l'origine des tissus sur la néoformation de fleurs. 70
C) Rôle du milieu de base 71
D) Action de l'acide 3-indolyl-acétique. 71
E) Rôle des composés phénoliques et produits voisins. 73
F) Nécessité d'un traitement préalable par le froid. 73
G) Effet de l'acide gibbérellique. 77
H) Remplacement de l'effet du froid par l'application de kinétine et de tocophérol. 79
I) Rôle de la photopériode 81
J) Application à *N. suaveolens* des connaissances acquises avec l'endive sur la formation des fleurs. 84
K) Discussion. 86

IV. — **CONCLUSIONS GÉNÉRALES**. 93

BIBLIOGRAPHIE 97

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

" Les Phénol-Oxydases des végétaux. "

Vu et approuvé :
Paris, le 24 juin 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

Nemours - Imp. André Lesot 30-10-65
Dépôt légal 643-4-65

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

Fig. 1. — Aspect de tronçons de tige de *Nicotiana glauca* après trois semaines de culture sur le milieu témoin contenant 1 mg/l d'AIA (T), et le même milieu additionné de 1 mg/l de kinétine (Kin. 1). Aucun bourgeon ne s'est formé.

Fig. 2. — Aspect de tronçons de tige de *Nicotiana suaevolens* après trois semaines de culture sur le milieu témoin contenant 1 mg/l d'AIA (T), et le même milieu additionné de 1 mg/l de kinétine (Kin. 1). Toutes les cultures bourgeonnent sur le milieu témoin, mais la kinétine intensifie encore le bourgeonnement.

Fig. 1

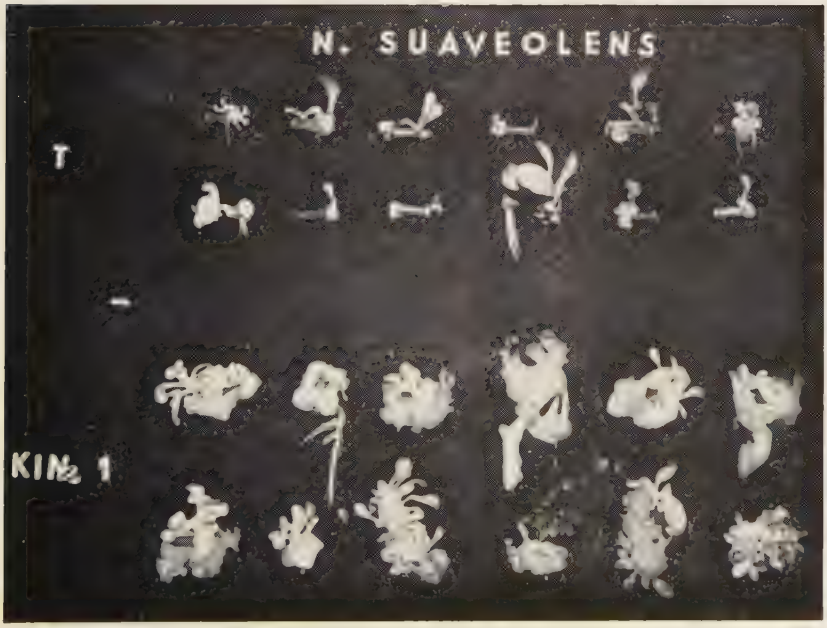
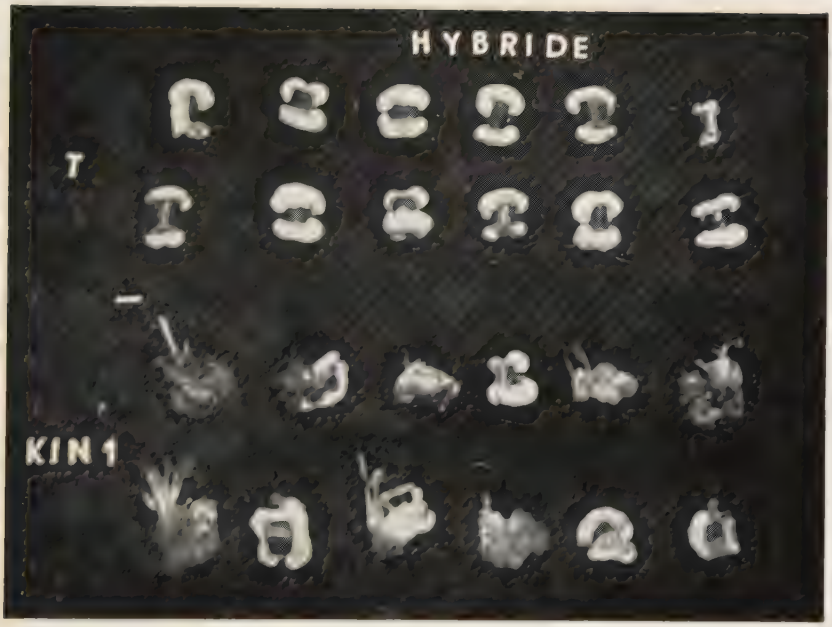


Fig. 2

EXPLICATION DE LA PLANCHE II

Aspect de tronçons de tige de l'hybride *N. pluma* × *N. suaveolens* après trois semaines de culture sur le milieu témoin contenant 1 mg/l d'AIA (T), et le même milieu additionné de 1 mg/l de kinétine (K) (× 1). Le développement du bourgeon axillaire du milieu témoin a été arrêté par la formation de bourgeons.


HYBRIDE
T
KIN 1

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

Action du 5-fluorouracile sur le bourgeonnement *in vitro* de fragments de tige de *N. suaveolens*.

1 : Témoins milieu S. — 2 : + 5 FU 10^{-5} *M*. — 3 : + 5 FU 10^{-4} *M*. — 4 : + 5 FU 10^{-3} *M*. — 5 : + 5 FU 10^{-5} *M* + Ac. orotique $3 \cdot 10^{-5}$ *M*. — 6 : + 5 FU 10^{-4} *M* + Ac. orotique 3×10^{-4} *M*. — 7 : + 5 FU 10^{-3} *M* + Ac. orotique 3×10^{-3} *M*. — 8 : + Acide orotique 3×10^{-3} *M*.

1
2
3
4
5
6
7
8

EXPLICATION DE LA PLANCHE IV

Aspect de tronçons de tige de *N. suaveolens* cultivés pendant trois semaines sur le milieu témoin (T) et sur le même milieu additionné d'extrait brut de feuilles de *N. suaveolens* (S), de l'hybride (H) et de *N. glauca* (G.) On remarque la formation de racines sur certaines des cultures ayant poussé sur l'extrait d'hybride et sur presque toutes celles faites sur l'extrait de *N. glauca*.

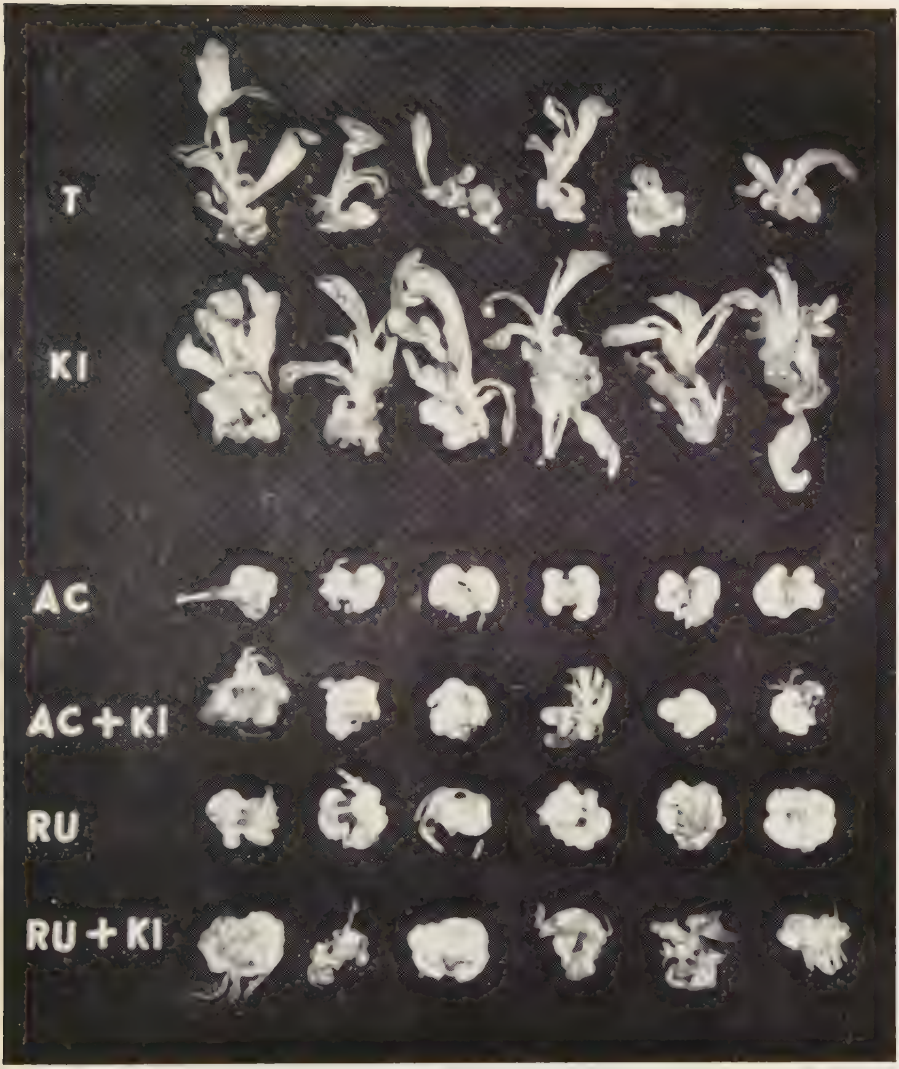
T
S
H
G

EXPLICATION DE LA PLANCHE V

Action de l'acide chlorogénique (AC) et de la rutine (RU) sur le bourgeonnement de tronçons de tige de *N. suaveolens* cultivés *in vitro* avec ou sans kinétine (KI), mais toujours en présence d'acide 3-indolyl-acétique (1 mg/l).

T = milieu témoin ; KI = kinétine (1 mg/l) ; AC = acide chlorogénique (5×10^{-5} *M*) ; RU = rutine (5×10^{-6} *M*).

On remarque que la suppression du bourgeonnement est totale par les composés phénoliques employés sans kinétine, presque totale avec kinétine. De plus, l'acide chlorogénique et la rutine provoquent la formation de racines.


T
KI
AC
AC+KI
RU
RU+KI

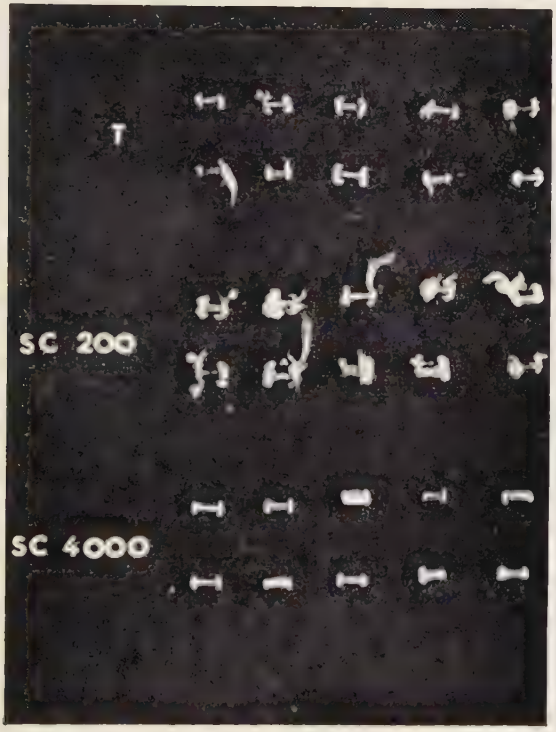
EXPLICATION DE LA PLANCHE VI

Action de la scopolétine (200 et 4000 µg/l) sur le bourgeonnement des tronçons de tige de *N. suaveolens* :

a) en présence ou non de kinétine (100 et 200 µg/l),

b) action de la scopolétine seule.

(*a*)



(*b*)

EXPLICATION DE LA PLANCHE VII

Mise en évidence de la synergie auxine-acide chlorogénique dans l'inhibition du bourgeonnement des fragments de tige de l'hybride *N. suaveolens* × *N. glauca*. Les cinq premières lignes correspondent à des milieux sans AIA, les trois dernières à des milieux contenant 1 mg/l d'AIA. Milieu de base S. Concentrations en acide chlorogénique : $AC_1 = 10^{-6}$ *M*, $AC_2 = 10^{-5}$ *M*, $AC_3 = 10^{-4}$ *M*, $AC_4 = 10^{-3}$ *M*, $AC_I = 10^{-6}$ *M*, $AC_{II} = 10^{-5}$ *M*.

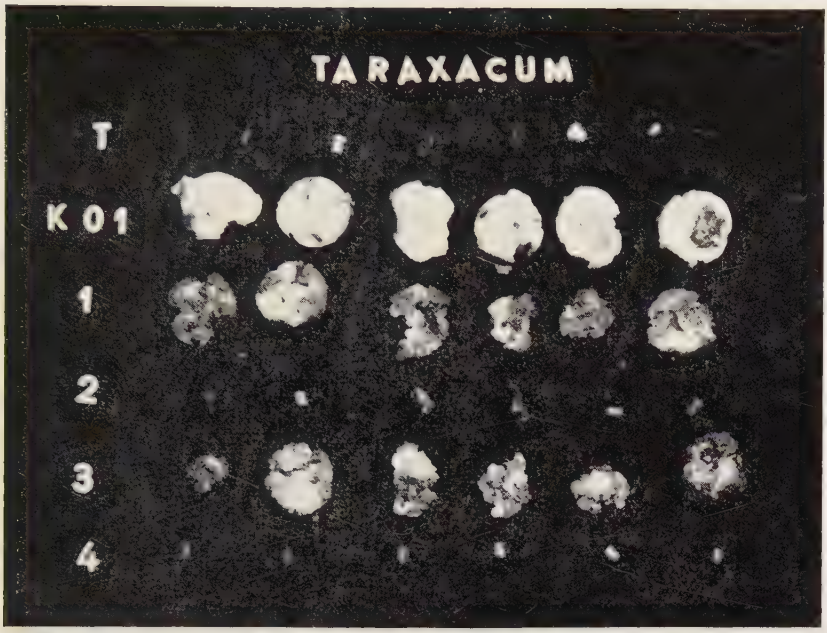
HYBRIDE
T
AC 1
AC 2
AC 3
AC 4
T AIA
AC I
AC II

EXPLICATION DE LA PLANCHE VIII

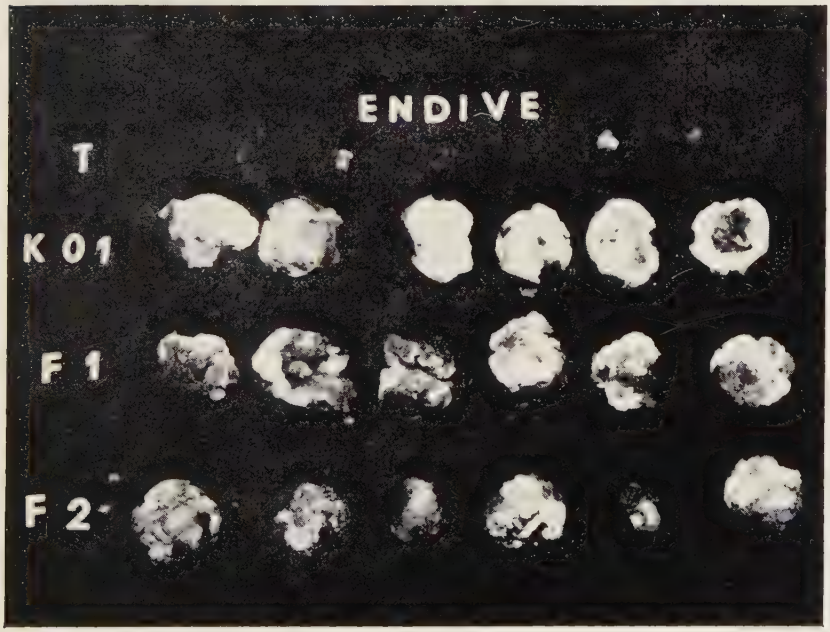
Action, sur le test moelle de tabac, des extraits chromatographiés de *Taraxacum* et de *Cichorium*. T = milieu témoin S ; K = + kinétine (0,1 mg/l).

a) Eluats des bandes 1, 2, 3, et 4 du *Taraxacum*,

b) Eluats des bandes 1 et 2 du *Cichorium*.



(*a*)



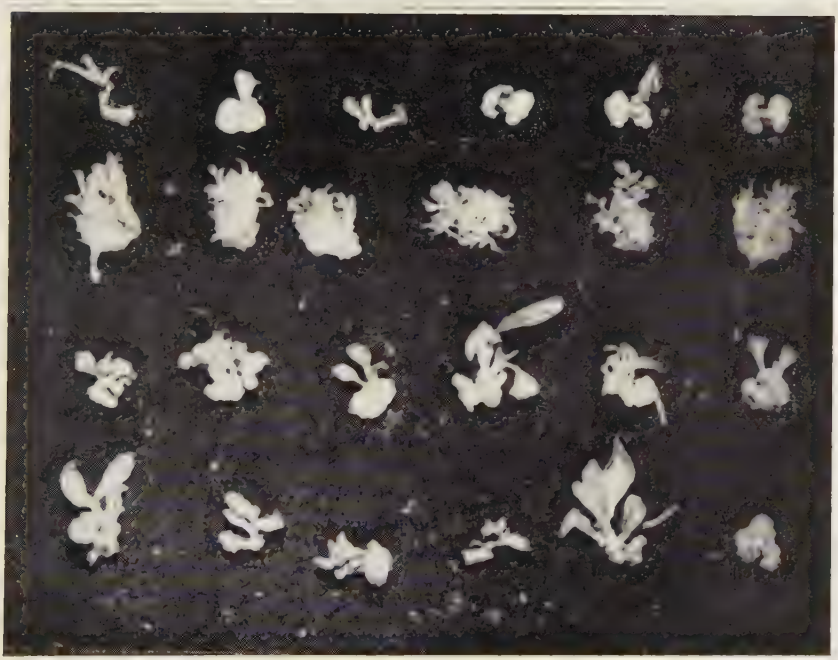
(*b*)

EXPLICATION DE LA PLANCHE IX

Action, sur le bourgeonnement de fragments de tige de *N. suaveolens*, des extraits chromatographiés de *Taraxacum* (*a*) et de *Cichorium* (*b*).

Mêmes zones que pour la Planche VIII.

(*a*)



(*b*)

EXPLICATION DE LA PLANCHE X

Fig. 1. — Bourgeonnement de fragments de tige de *Nicotiana glauca* cultivés *in vitro* sur le milieu S, avec 1 % de saccharose. O = milieu sans auxine ; A = avec 1 mg/l d'AIA.

Fig. 2. — Aspect d'une fleur de *Cichorium intybus* « Witloof » obtenue sur culture de racine vernalisée.

A gauche : dans le tube ; *à droite* : hors du tube.

Fig. 1

Fig. 2

EXPLICATION DE LA PLANCHE XI

Fig. 1. — Fleur d'endive sans feuilles intermédiaires obtenue sur fragment de racine vernalisée, cultivé en présence d'acide gibbérellique.

A gauche : fleur dans le tube : *à droite* : culture sortie du tube (un bourgeon végétatif adjacent a été enlevé pour permettre une meilleure photographie).

Fig. 2. — Développement d'une fleur sur culture de tige de *N. suaveolens*

A gauche : culture fleurie dans le tube, le capuchon du tube ayant été enlevé pour la photographie ; *à droite* : culture sortie du tube.

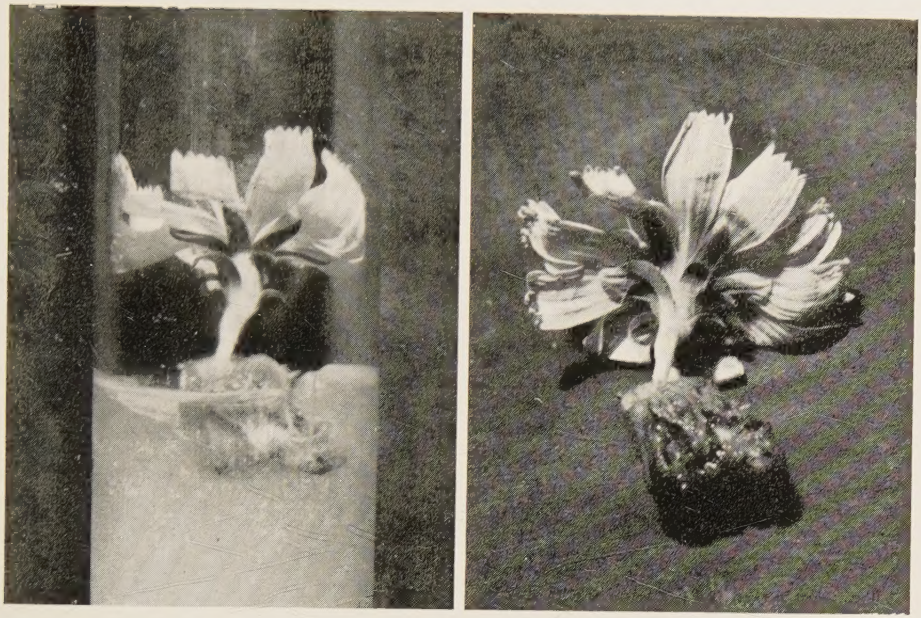


Fig. 1

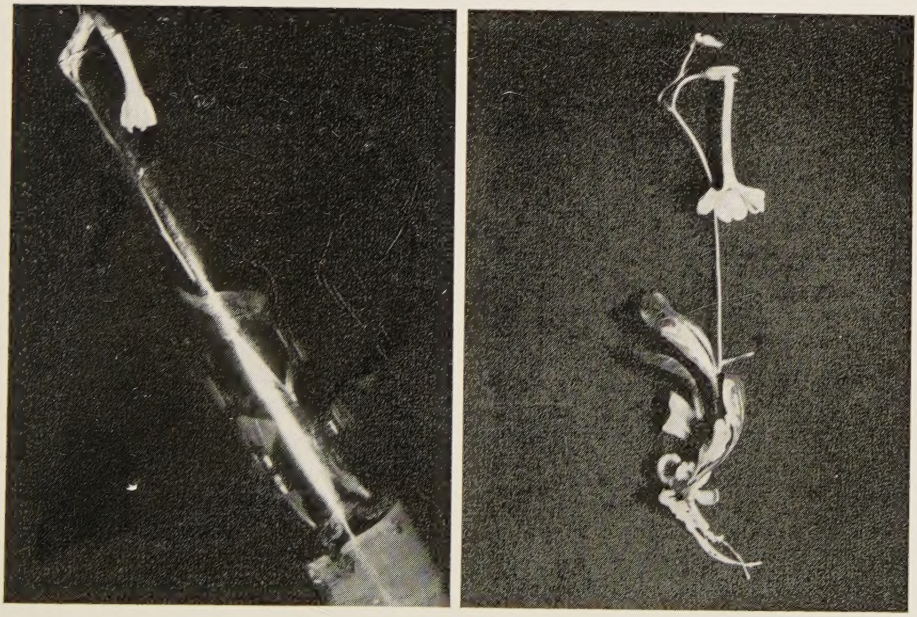


Fig. 2